

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Développement d'un Biochips à ADN pour analyser l'expression différentielle des gènes liés au vieillissement cellulaire

Fustin, Jean-Michel

Award date:
1999

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Développement d'un Biochips à ADN pour analyser l'expression
différentielle des gènes liés au vieillissement cellulaire**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Jean-Michel FUSTIN

Juin 1999

FNB n/1999/7

FACULTES
UNIVERSITAIRES
N.-D. DE LA PAIX
NAMUR

Bibliothèque

FMB

4/1999/7



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Développement d'un Biochips à ADN pour analyser l'expression
différentielle des gènes liés au vieillissement cellulaire**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Jean-Michel FUSTIN

Juin 1999

LS 8769901

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Développement d'un biochips à ADN pour analyser l'expression différentielle des gènes liés au vieillissement.

FUSTIN Jean-Michel

Résumé

La problématique du vieillissement est complexe et fait l'objet de recherches très actives. Les études récentes tentent de mettre en évidence les changements d'expression génique associés au vieillissement cellulaire, et ce en utilisant différentes techniques comme le Northern Blot ou l'hybridation soustractive.

Nous avons dans ce travail étudié l'expression de l'ARNm de gènes découverts comme étant associés à la sénescence répllicative par la technique des damiers à ADN sur lesquels nous hybriderons les ADNc rétrotranscrits à partir de populations d'ARNm issues de cellules jeunes ou âgées. Nous avons choisi cette technique car elle possède la capacité de détecter très vite, en une seule expérience, une grande quantité de gènes différents dans un échantillon d'acides nucléiques.

Les premiers résultats montrent bien, avec quelques réserves cependant, que différents gènes, à savoir la GTP- α binding protein, SM22, l'ostéonectine et l'apolipoprotéine J sont surexprimés chez des fibroblastes WI-38 âgés par rapport à leurs homologues jeunes.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1999

Promoteur: J. Remacle.

" Hélas ! Je demeure et le Maître s'en va, alors que j'aurais encore tant à apprendre de lui ! "

" Assez, Ananda ! Ne te trouble pas. Ne t'ai-je pas dit souvent qu'il est dans la nature des choses qui nous sont les plus proches et les plus chères que nous devions nous en séparer, les quitter, nous en priver ? "

Comment serait-il possible, Ananda, que ce qui est né, ament à l'existence, compost, qui contient, inhérent à soi-même, le principe de sa dissociation, comment serait-il possible qu'une telle chose ne se dissolve pas ? Cela ne peut pas être. "

Discussion entre Bouddha et son
cousin, à l'aube de la mort du
Maître.

Remerciements

Lecteur, cette partie est la seule de ce mémoire qui n'ait pas été touchée par la longue procession des correcteurs, donc ne vous étonnez pas si vous y trouvez un contenu peu scientifique, sans rigueur aucune et dépourvu de toute barbarie linguistico-terminologique.

Devant ce clavier muet, ces touches froides et insensibles qui ne m'apportent aucune aide, je ne puis me décider à trier dans un ordre quelconque toutes les personnes qui ont posé les yeux sur ce mémoire. Forcément celles qui seront au début s'estimeront favorisées par rapport aux autres, et, de ce fait, je serais tenté de nommer quelque académicien dans les premières lignes, histoire de faire bonne figure...

Pourtant, il me faut me décider car ce mémoire doit être bouclé d'ici quelques semaines. Alors voici ce que je vous propose : un classement temporel où les premières personnes citées seront les plus anciennes dans l'histoire de ma vie. Comme cela, si vous, lecteur, n'êtes pas satisfait de votre place dans ces remerciements, je ne pourrais vous dire que : "Il fallait me connaître avant !".

Allons-y, donc, et advienne que pourra :

Petite Mère, tu as toujours été là, c'est pourquoi ce mémoire t'est dédié. Excuse-moi si pour quelque impératif scientifique je dû l'écrire avec des mots si peu familiers. Pour toi j'aurais voulu le faire comme un conte... Merci.

Frère, sœur aînés je vois dois beaucoup aussi. Toi, Charles-André, parce que tes coups d'antan me font plus apprécier ta sagesse d'aujourd'hui. Bonne chance pour ta thèse. Toi, Marie-Catherine, parce que ta différence est la plus grande des richesses. Bonne chance pour la Philosophie, l'Orientalisme et tout le reste que je ne peux dévoiler ici.

Catherine, ma douce, tu es en troisième position sur cette feuille mais celle-ci ne représente aucunement la place que tu occupes dans mon cœur et mon âme. Reste telle que tu es, ne déprécie pas ta valeur, et continue tes expéditions punitives !

Marian, un grand merci à toi pour tes attentions et tes conseils universels.

Merci à GroBeürk, qui a supporté mes calembours pendant toutes ces années. Je me rends compte, maintenant, que ce devait être foudroyant. Mais non ta musique n'est pas sauvage !

Merci à vous, amis et amies, car mes dernières années, c'est à vous que je les dois. L'ambiance était pile-poil et ce serait dommage que cette phrase reste à l'imparfait.

Merci à Monsieur Remacle, et à sa motivation vitaminée. Je suis heureux d'avoir dirigé mon choix vers son laboratoire (sic !).

Merci à Nathalie, Sandrine, Isabelle, Françoise, Pierre-Emmanuel et beaucoup d'autres pour mon intégration dans le projet "chips" et leurs travaux de corrections.

Merci à Patrick et Olivier car vous m'avez transmis vos gènes, et j'en exprime ma gratitude. Merci spécialement à Patrick pour ses corrections transcendantes qui, il faut bien le dire, ont véritablement transfiguré ce mémoire.

Merci à tout le labo pour l'ambiance, le thé et les biscuits.

Merci aux professeurs, qui ont livré leur savoir, mais c'était moins gai quand ils s'assuraient du nôtre.

Merci _____
_____ (compléter les blancs)

I.) Introduction

A.) Avant-propos	1
B.) Introduction	2
C.) Les Biomarqueurs du vieillissement cellulaire	3
C.1.) Sénescence répllicative	3
C.2.) Morphologie altérée	4
C.3.) Activité β -galactosidase associée à la sénescence	5
C.4.) Altérations du génome mitochondrial	5
C.5.) Raccourcissement télomérique	6
C.6.) Changements dans le cycle cellulaire	7
a.) Répression des gènes de réponses précoces	7
b.) Répression des gènes responsables de la progression du cycle vers la phase S	8
c.) Répression de cyclines et CDK's	8
d.) Surexpression de p21	8
C.7.) Modification de l'expression génique non directement liée au cycle cellulaire	9
D.) Utilisation d'un test pour l'analyse de l'expression différentielle	9
E.) Mise en évidence des ARN	12
E.1.) Le Northern Blot	12
E.2.) La RT-PCR quantitative	13
E.2.1.) La RT-PCR compétitive	13
E.2.2.) La RT-PCR semi-quantitative	14
F.) Les micro-damiers à ADN	14
F.1.) Principe	15
F.1.1.) Fixation des trappeurs	16
a.) Choix du support	16
b.) Méthodes d'adressage de l'ADN sur le support	16
c.) Formation de la liaison entre l'ADN et le support	18
F.1.2.) Le choix des cibles	18
F.1.3.) Les moyens de détection	19
G.) Objectifs	20

II.) Matériels et Méthodes

A.) Préparation d'ADN plasmidique	21
A.1.) Principe	21
A.2.) Matériels	21
A.3.) Méthode	22
B.) Estimation de la quantité et de la pureté d'ADN	23
B.1.) Principe	23
B.2.) Protocole	23
C.) Restriction d'ADN	24
C.1.) Principe	24

C.2.) Matériels	24
C.3.) Protocole	24
D.) Electrophorèse sur gel d'agarose	25
D.1.) Principe	25
D.2.) Matériel	26
D.3.) Protocole	26
E.) Polymerase chain reaction (PCR)	27
E.1.) Principe	27
a.) La polymérase	28
b.) Les amorces	28
c.) Hot start	29
d.) Utilisation du diméthylsulfoxyde (DMSO)	29
E.2.) Matériels	29
E.3.) Protocole	30
F.) Maxi-préparation de plasmides	30
F.1.) Matériel	31
F.2. Méthode	31
G.) Séquençage	32
G.1.) Principe	32
G.2.) Matériels	33
G.3.) Protocole	33
G.4.) Purification	34
H.) Production des trappeurs et des cibles	34
H.1.) Production des trappeurs	34
H.2.) Production des cibles	35
H.3.) Méthode	35
I.) Purification des produits PCR	36
I.1.) Principe	36
I.2.) Matériels	36
I.3.) Protocole	36
J.) Fixation des trappeurs sur lames de verre	37
J.1.) Principe	37
J.2.) Matériels	38
J.3.) Méthode	38
K.) Hybridation d'ADN cible sur les microdamiers	39
K.1.) Principe	39
K.2.) Matériels	40
K.3.) Protocole	40
L.) Détection des microdamiers par précipitation de sels d'argent	41
L.1.) Principe	41
L.2.) Matériels	41
L.3.) Protocole	42
M.) Quantification	43

N.) Culture de fibroblastes WI-38	43
N.1.) Les cellules	43
N.2.) Conditions stérile	43
N.3.) Trypsinisation	43
N.4.) Conservation des cellules	44
O.) Extraction de l'ARN total	45
O.1.) Principe	45
O.2.) Matériel	46
O.3.) Protocole	47
P.) Vérification de la qualité des l'ARN sur gel d'agarose 1%	48
P.1.) Matériel	48
P.2.) Méthode	49
Q.) Purification des ARN messagers	49
Q.1.) Principe	49
Q.2.) Matériels	50
Q.3.) Protocole	51
R.) Rétro-transcription des ARNm et marquage des ADNc	51
R.1.) Principe	51
R.2.) Matériels	52
R.3.) Protocole	53

III.) Résultats et discussions

A.) Stratégie du mémoire	55
B.) Analyse des plasmides contenant les gènes d'intérêt	56
B.1.) Restrictions	57
B.2.) PCR	59
B.3.) Séquençage	60
C.) Synthèse des ADN-trappeurs	61
D.) Synthèse des ADN-cibles tests	63
E.) Fixation des trappeurs sur le verre	64
F.) Optimisation de l'hybridation	64
F.1.) Influence de la température.	64
a.) Conditions	64
b.) Résultats et analyse	65
F.2.) Etude de la spécificité	65
a.) Conditions	65
b.) Résultats et analyse	65
F.3.) Etude de la sensibilité	66
a.) Conditions	66
b.) Résultats et analyse	67
F.4.) Conclusions	69

Liste des abréviations présentes dans ce mémoire

μg : 10^{-6} gramme
 A : Adénosine
 ADN : acide deoxyribonucléique
 ADNc : acide deoxyribonucléique complémentaire
 APO-J : apolipoprotéine J
 ARN : acide ribonucléique
 ARNm : acide ribonucléique messenger
 ARNt : acide ribonucléique de transfert
 C : Cytosine
 CA : Californie
 CCOX : sous-unité III de la Cytochrome C Oxydase
 CDK: Cyclin Dependant Kinase
 CPD : Count of Population Doublings
 Cyc : cycline
 DEPC : diéthylpyrocarbonate
 DMSO : diméthyl sulfoxyde
 dNTP : dinucléotide triphosphate
 DTT : dithiothréitol
E. coli : *Escherischia coli*
 EDTA : Ethylène Diamine Tetra Acétique
 FGF : Fibroblast Growth Factor
 FIB : Fibronectine
 FRS-2 : β -phenylalanin tRNA synthase
 G : Guanine
 GAPDG : glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase
 Gp80 : glycoprotein 80
 GTP : α -guanine triphosphate binding protein
 HCMV : human cytomegalovirus
 HSF1 : Heat Shock Factor 1
 HSP : Heat Shock Protein
 Kb : 1000 paires de bases
 MES : beta morpholinoethanosulfate
 mM : 10^{-3} Mole
 MOPS : acide N-morpholino propanesulfonique
 ng : 10^{-9} gramme
 NIH : National Institute on Health
 nm : 10^{-9} mètre
 OST : Ostéonectine
 pb : paires de bases
 PBS : Phosphate Buffer Saline
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 PDGF : Plateled-Derived Growth Factor
 PMN : polymorphonucléaire neutrophile
 pRB : protéine du rétinoblastome
 PRO : α -1-(I) procollagène
 ROS : Reactive Oxygen Species
 RPM : Rotations Par Minute

RT : RétroTranscription
RT : Room Temperature (25°C)
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SM22 : Smooth Muscle protein 22
SRF : Serum Responsive Factor
STAV : streptavidine
SV-40 : Simian Virus 40
T : Thymidine
Taq : *Thermus aquaticus*
TBE : TRIS Borate EDTA
U : unité enzymatique
UV : Ultra-Violets
TRIS : Tris hydroxy méthyl aminométhane

G.) Analyse de l'expression différentielle au cours du vieillissement	69
G.1.) Hybridation d'ADNc de cellules jeune	69
a.) Conditions	69
b.) Résultats	70
G.2.) Hybridation d'ADNc provenant de cellules vieilles	71
a.) Conditions	71
b.) Résultats et analyse.	71
G.3.) Comparaison de l'expression des gènes dans les cellules jeunes et vieilles.	72

IV.) Conclusions et perspectives

H.) Conclusions et perspectives	74
---------------------------------	----

V.) Bibliographie

Annexes

Chapitre I : Introduction

A.) Avant-propos

De tout temps, le vieillissement a exercé sur les hommes un mélange de crainte et de respect : les sociétés patriarcales gouvernées par le plus vieil homme du village, le culte des ancêtres, le mythe de Matusalem,...

Le vieillissement peut être défini comme une altération progressive de l'organisme qui se traduit par une perte lente et continue de ses capacités. Cela est valable pour l'organisme pris dans sa globalité mais également pour un organe, un tissu, un type cellulaire donné.

Les effets de l'âge sur les individus sont nombreux. Parmi ceux-ci :

- Réduction de la taille.
- Modifications de la corpulence.
- Ralentissement du métabolisme.
- Diminution du rythme cardiaque, épaissement de la paroi cardiaque et augmentation des risques d'accidents cardiaques.
- Baisse du tonus musculaire et perte de masse musculaire entraînant un amaigrissement des membres supérieurs et inférieurs.
- Défaillance de la mémoire en dehors de toute maladie.
- Augmentation du risque de développement de diverses pathologies telles que les cancers, l'ostéoporose, la cécité, la maladie d'Alzheimer, certaines maladies cardio-vasculaires.
- Diminution de l'acuité sensorielle de façon générale.
- Efficacité réduite du système immunitaire : activité bactériolytique des PMN, activité cytolytique des Natural Killer en présence de cellules cancéreuses...

(The Baltimore Longitudinal Study of Aging, Shock, 1984)

De manière régulière et principalement depuis le début du vingtième siècle, l'espérance de vie de l'homme ne cesse de croître. Cependant, cela est surtout dû aux différents progrès réalisés en médecine (hygiène, lutte contre les maladies infectieuses,...) plutôt qu'à une meilleure

compréhension du processus du vieillissement. Par opposition, le taux de natalité dans nos pays occidentaux est en décroissance régulière. En conséquence, les populations de nos pays vieillissent. En 1990, dans les pays industrialisés, les personnes âgées de plus de 60 ans représentaient 17,7 % de la population. On estime que, en 2020, cette proportion sera de 23,04 % (Cunha-Vaz, 1998). D'ici quelques décennies, on peut donc penser qu'une proportion importante de la population sera constituée de personnes âgées.

Il est donc crucial que le vieillissement des populations futures se passent le plus sainement possible sans les pathologies incapacitantes (maladie d'Alzheimer, de Parkinson, dystrophie,...) qui font du quatrième âge un âge de dépendance. En effet, il est à craindre que le poids social d'une population trop âgée et malade ne devienne très lourd.

Avec la biologie, nous avons en main les connaissances nécessaires pour enfin comprendre cette partie de la vie et les relations complexes qui existent entre le vieillissement et le développement de maladies ou de handicaps. Comprendre, non pas pour annihiler le vieillissement et allonger la vie, mais plutôt pour qu'il se passe sainement.

B.) Introduction

Ces cinquante dernières années, de nombreuses études sur le vieillissement ont vu le jour un peu partout, notamment en Amérique avec Nathan Shock (1958) qui créa le National Institute of Aging à Baltimore. Le vieillissement est donc devenu un sujet de recherche majeur pour ceux qui s'intéressent à l'avenir.

De nombreuses théories se sont succédées (plus de 300) (Medvedev, 1989), chacun croyant pouvoir expliquer les mécanismes du vieillissement à partir de ses propres découvertes (Goldstein, 1989).

Après des modèles intégratifs mettant en exergue les organes entiers, très vite, les théories cellulaires ont pris le dessus. En effet, les tissus ou organes sont eux-mêmes composés de cellules qui subissent les effets du temps selon leur fonction, leur activité, leur état de différenciation,... En

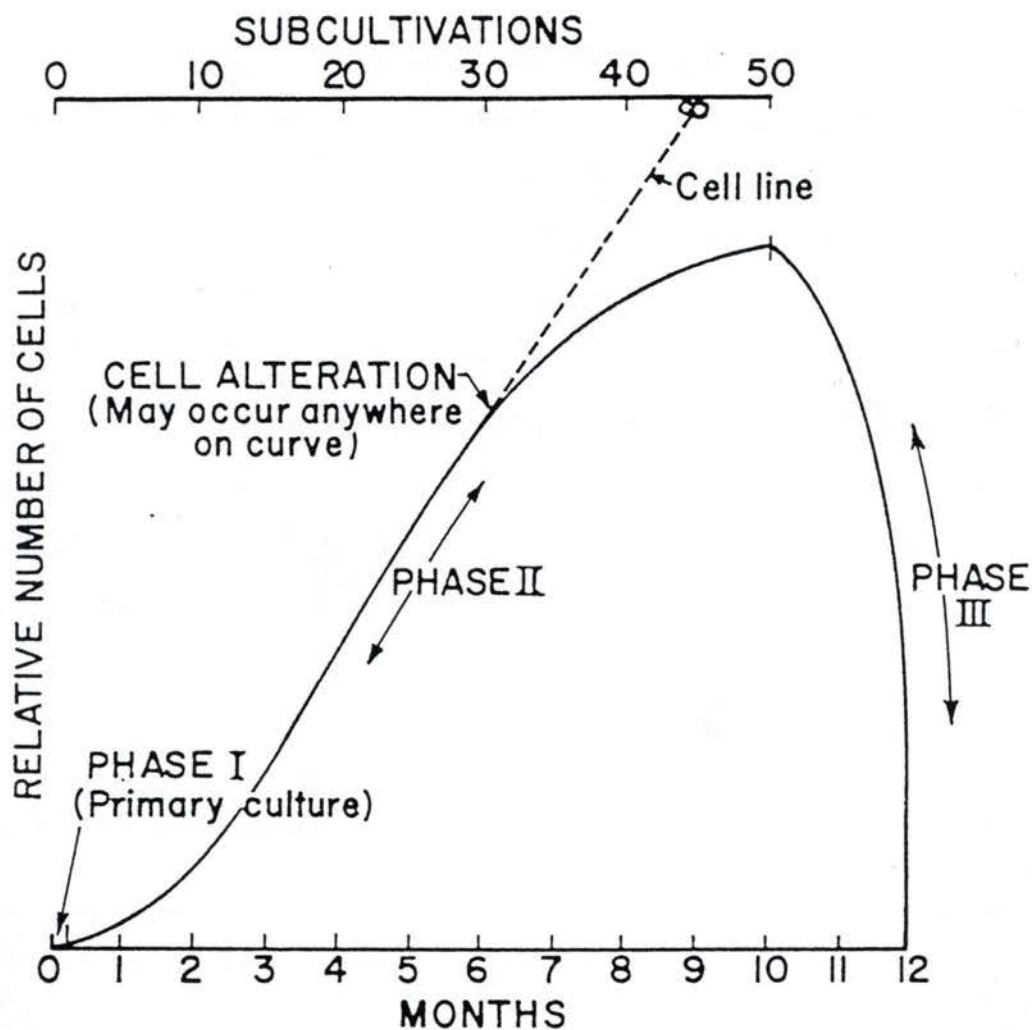


Figure I.1.) Graphique de Hayflick (*in Handbook of the Biology of Aging*, 1977). Dans la phase I, la culture primaire se termine lorsqu'une première population de cellules atteint la confluence. La phase II correspond à une phase de croissance exponentielle. En fin de phase II, le rythme des divisions cellulaires ralentit progressivement. A ce moment, il peut y avoir transformation et les cellules acquièrent alors un potentiel prolifératif infini (cell line). Finalement, les cellules arrêtent de se diviser et entrent en sénescence.

comprenant mieux ce qui se passe à l'intérieur de l'unité fondamentale du vivant, la dynamique du vieillissement pourra alors être perçue.

Dès lors, comment le vieillissement s'exprime-t-il à l'intérieur des cellules ?

Les prochains paragraphes donneront un aperçu de l'effet de l'âge sur les cellules. Nous nous focaliserons plus spécialement sur le fibroblaste, type cellulaire étudié durant ce présent travail.

C.) Les biomarqueurs du vieillissement cellulaire

C.1.) Sénescence répllicative

La majorité des cellules eucaryotes normales ont un potentiel prolifératif limité (voir figure I.1.). Celui-ci varie principalement selon le type cellulaire, l'âge du donneur ou l'espèce. Le graphique, présenté à la figure 1, montre qu'une population de cellules en culture évolue à travers différentes phases (Hayflick, 1961). La première, appelée phase de latence, débute dès la mise en culture de l'échantillon et correspond à l'adaptation des cellules à leur nouveau milieu. Elle se termine par l'obtention d'une première population de cellules. La longueur de cette phase augmente avec l'âge du donneur. Vient ensuite une période de croissance exponentielle se terminant par un ralentissement progressif du rythme des divisions cellulaires. A partir d'un certain moment, les cellules arrêtent définitivement de se diviser, tout en restant viables et métaboliquement actives. C'est ce processus que l'on appelle sénescence répllicative, ou limite de Hayflick. Les cellules sénescents ne répondent plus aux facteurs de croissance (PDGF, FGF, ...). De plus, cet état est dominant, car lors d'une fusion entre une cellule proliférative et une cellule sénescents, l'hybride obtenu est, dans tous les cas, incapable de proliférer (Norwood *et al.*, 1974 ; Muggleton-Harris, 1976 ; Bunn, 1980 ; Muggleton-Harris, 1980 ; Pereira-Smith, 1983). Ceci est aussi observé lorsque des cellules tumorales sont fusionnées à des cellules sénescents

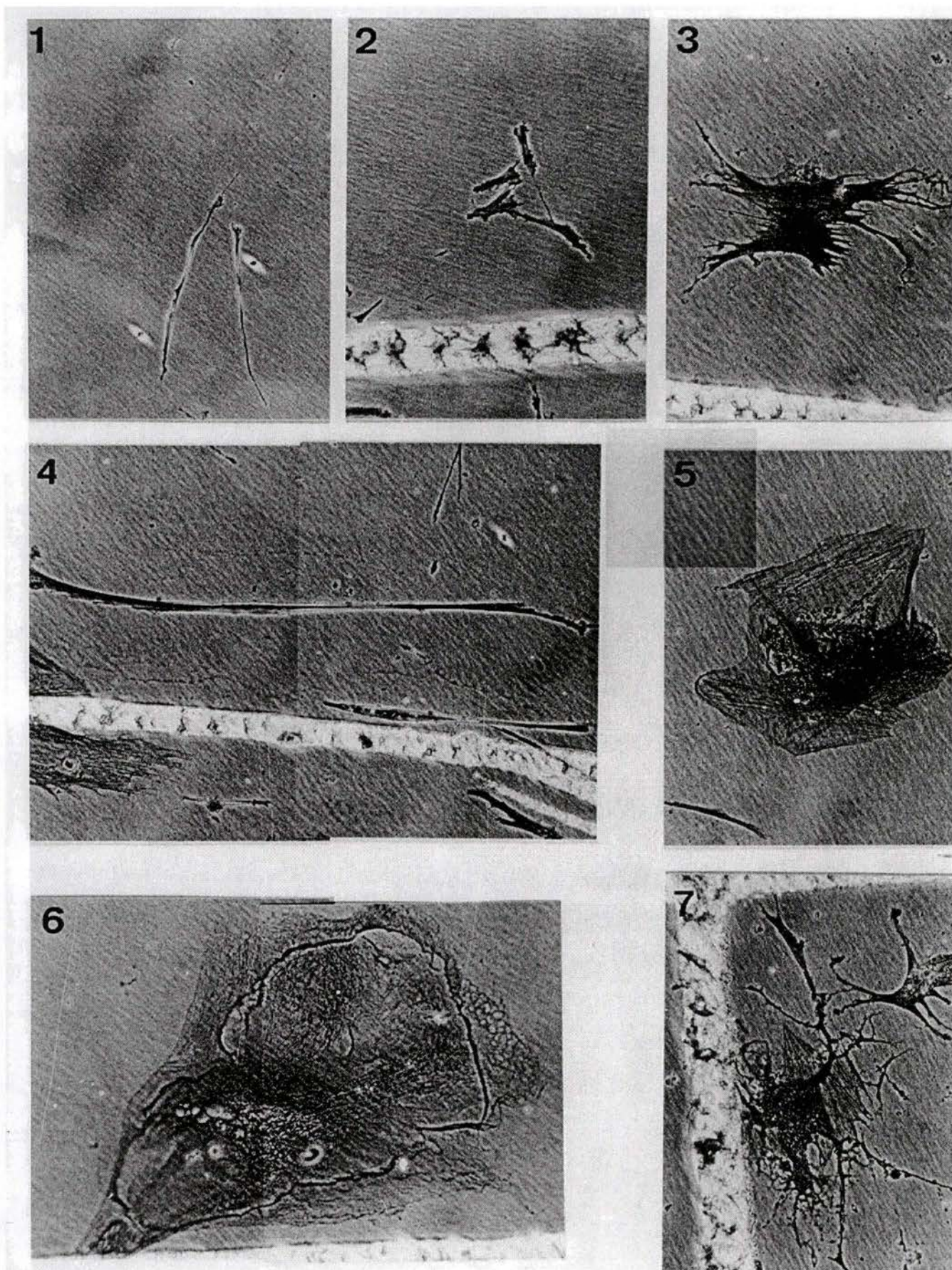


Figure I.2.) Fibroblastes WI-38 humains présentant les morphotypes mitotiques (1-2-3) et post-mitotiques (4-5-6). Le morphotype 7 est la dégénérescence du 6.

(Pereira-Smith, 1983). Cela laisse donc supposer que la sénescence répllicative est le résultat de la présence dans ces cellules d'un ou plusieurs facteurs dominants qui les rendent réfractaires à la division cellulaire. Il ne s'agit pas d'un blocage total des voies de transduction du signal, car une majorité des facteurs de transcription restent activables.

Diverses études du potentiel prolifératif *in vivo* ont montré que la sénescence répllicative n'est pas un artéfact de culture (Schneider, 1996). Ainsi, la présence de cellules sénescents *in vivo* a été démontrée directement par détection *in situ* de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (voir le paragraphe C.3). On observe également que les cellules issues de donneurs âgés ont un potentiel prolifératif réduit par rapport à celles d'un individu jeune ou d'embryons. L'âge du donneur est donc inversement proportionnel au potentiel prolifératif de ses cellules, ce qui démontre indirectement que la notion de limite du potentiel prolifératif est également d'application *in vivo*.

C.2.) Morphologie altérée

La plus évidente modification qui accompagne le vieillissement des fibroblastes est l'altération progressive de leur morphologie (Bayreuther *et al.*, 1988). De petite taille et élancé dans sa jeunesse, le fibroblaste termine sa vie proliférative avec un corps cellulaire arrondi et très volumineux. Entre ces deux extrêmes, diverses morphologies intermédiaires ont été décrites. Dans cette multiplicité de formes, sept morphotypes ont été déterminés. Il a été établi qu'au cours de leur vieillissement, les fibroblastes évoluaient à travers ces différents stades. Les trois premiers morphotypes sont dits mitotiques, correspondant donc à des cellules jeunes, tandis que les trois suivants sont dits post-mitotiques. Ils ne présentent aucune activité proliférative et sont donc caractéristiques des cellules sénescents. Le morphotype VII, nécrotique, est la dégénérescence du VI (voir figure I-2). Les proportions relatives des différents morphotypes varient avec le nombre de passages en cultures et avec l'âge du donneur. Les morphotypes IV, V, VI sont plus abondants dans des biopsies de tissus âgés (Bayreuther *et al.* 1988).

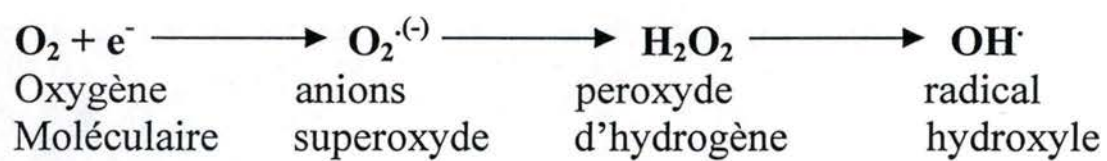


Figure I.3.) Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS). 2 à 3 % des électrons transférés dans la chaîne de transport des membranes mitochondriales internes sont largués hors de ces membranes. Ces électrons réagissent alors avec de l'oxygène pour former ces radicaux toxiques.

Ces différents "jalons" du vieillissement représentent un outil puissant pour l'étude du vieillissement prématuré induit par des stress (Toussaint *et al*, 1998).

C.3.) Activité β -galactosidase associée à la sénescence

Découverte en 1995, cette activité enzymatique est spécifique aux cellules sénescents. On l'a mise en évidence dans divers types cellulaires prolifératifs : fibroblastes, kératinocytes,...(Dimri *et al*, 1995). Elle est absente des cellules jeunes et des cellules transformées.

De plus, le pH optimum de cette β -galactosidase est de pH 6,0 alors que les β -galactosidases lysosomiales sont actives à pH 4,0. Sous certaines précautions expérimentales, cette activité enzymatique s'est révélée un excellent marqueur de la sénescence répllicative tant *in vitro* qu'*in vivo*.

C.4.) Altérations du génome mitochondrial

Les mitochondries sont des organites essentiels dans le métabolisme cellulaire : production d'énergie par la chaîne de transport des électrons. Les mitochondries sont d'ailleurs particulièrement abondantes dans les cellules à haute demande énergétique (hépatocytes, neurones,...) (Lodish, 1999).

Mais cette fonction n'est pas sans inconvénient. Les mitochondries utilisent la majeure partie de l'oxygène consommé par la cellule et, ce faisant, elles génèrent des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) : on estime que 2 à 3 % de l'oxygène consommé par une cellule donnent lieu à des ROS (Chance *et al.*, 1979). Ceux-ci (voir figure I.3.) vont réagir avec les constituants mitochondriaux et cellulaires : ADN, ARN, protéines, lipides,...(Davies, 1987 ; Simic *et al.*, 1989). Bien que la cellule dispose d'une batterie de systèmes de défense, ils ne sont pas totalement efficaces et une fraction de ces ROS demeure active et

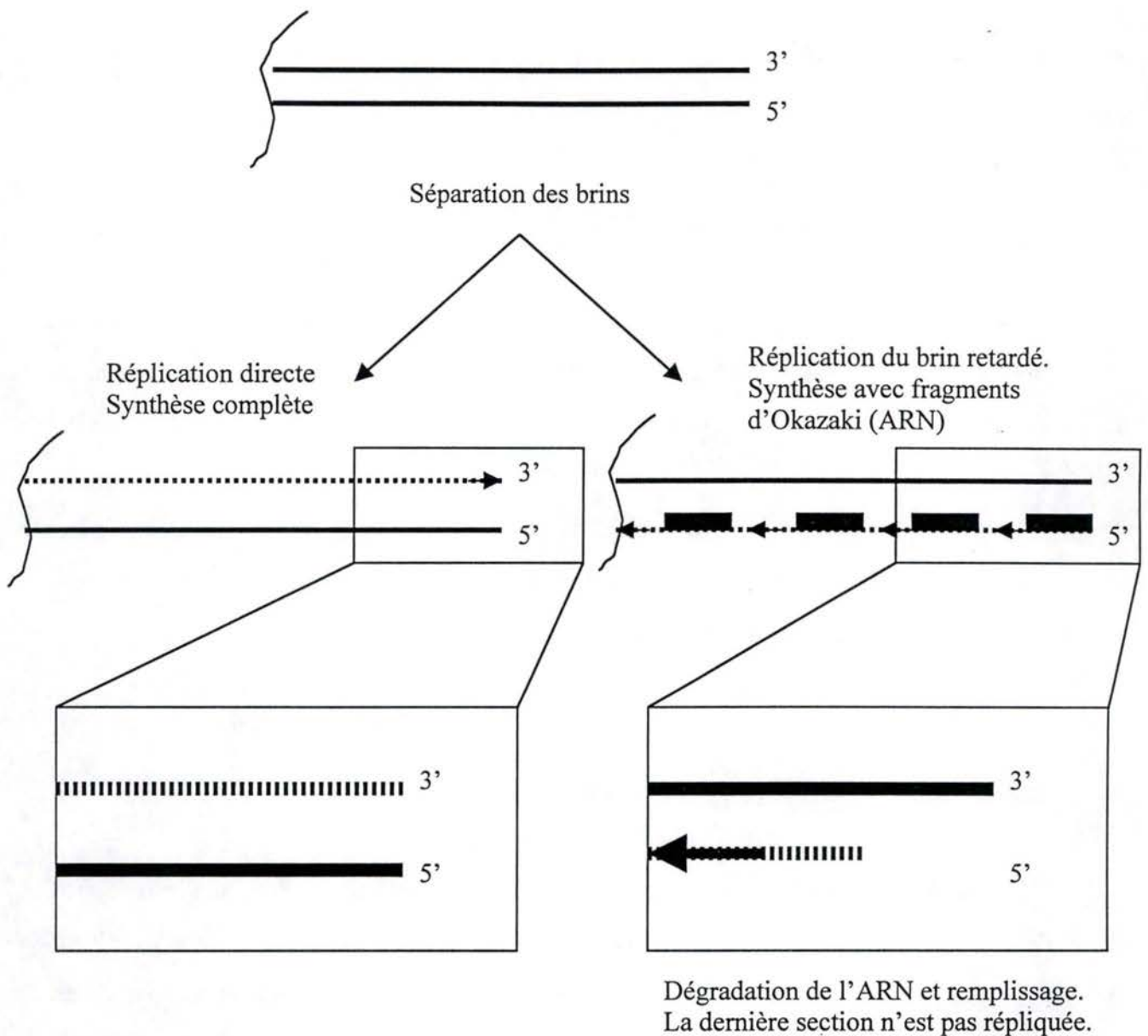


Figure I.4.) Représentation schématique de la répllication de l'ADN. La répllication directe ne provoque pas de "gap". Par contre, pour la répllication du brin retardé, la dégradation des amorces d'ARN (fragments d'Okazaki) provoque un trou non répliqué à l'endroit de l'amorce terminale. Les rectangles noirs représentent les fragments d'Okazaki. Les lignes interrompues représentent l'ADN nouvellement répliqué, les lignes continues l'ADN matrice.

occasionne des dommages qui s'accumulent au cours du vieillissement de la cellule (Remacle *et al.*, 1992).

Au cours du vieillissement cellulaire, on a montré que le génome mitochondrial accumule de nombreuses mutations ponctuelles et délétions (Lee *et al.*, 1997).

Les gènes ciblés par ces délétions codent pour certains enzymes de la chaîne de transport des électrons, cette dernière devient alors inactive. On perçoit, cependant, que ce n'est pas simplement la présence des délétions, mais plutôt leur fréquence dans toutes les mitochondries qui est un facteur important. En effet, si une seule mitochondrie est touchée, les autres pourront compenser ce manque.

Ces délétions et mutations ont été mises en évidence *in vivo* (biopsies de peau, de muscle, de cœur, de rein) et, surtout, dans des cellules à haute demande énergétique (Pang *et al.*, 1994 ; Yang *et al.*, 1994).

D'autres études ont montré que ces délétions apparaissaient également lors du vieillissement *in vitro* des fibroblastes, mais à une fréquence beaucoup plus faible (Dumont *et al.*, soumis).

C.5.) Raccourcissement télomérique

Les télomères constituent les extrémités des chromosomes et sont composés de la juxtaposition d'un très grand nombre de courtes séquences répétées : (TTAGGG)_n chez l'homme. La longueur de ces télomères est de 10-14 Kb chez les cellules jeunes. On a remarqué que leur longueur diminuait progressivement au cours du vieillissement à raison de 15 bp par année *in vivo* et de 50 bp par doublement de population *in vitro* (Campisi *et al.*, 1996).

Ce raccourcissement est dû à la dégradation de l'amorce d'ARN située en position terminale pour la réplication du brin retardé (voir figure I-4) (Levy *et al.*, 1992).

Selon la théorie acceptée, quand un ou plusieurs télomères arrivent à une longueur critique, la cellule devient sénescence (Campisi *et al.*, 1996). Actuellement, on ne connaît pas le mécanisme précis qui relierait le raccourcissement des télomères à l'entrée en sénescence. Cependant, on peut

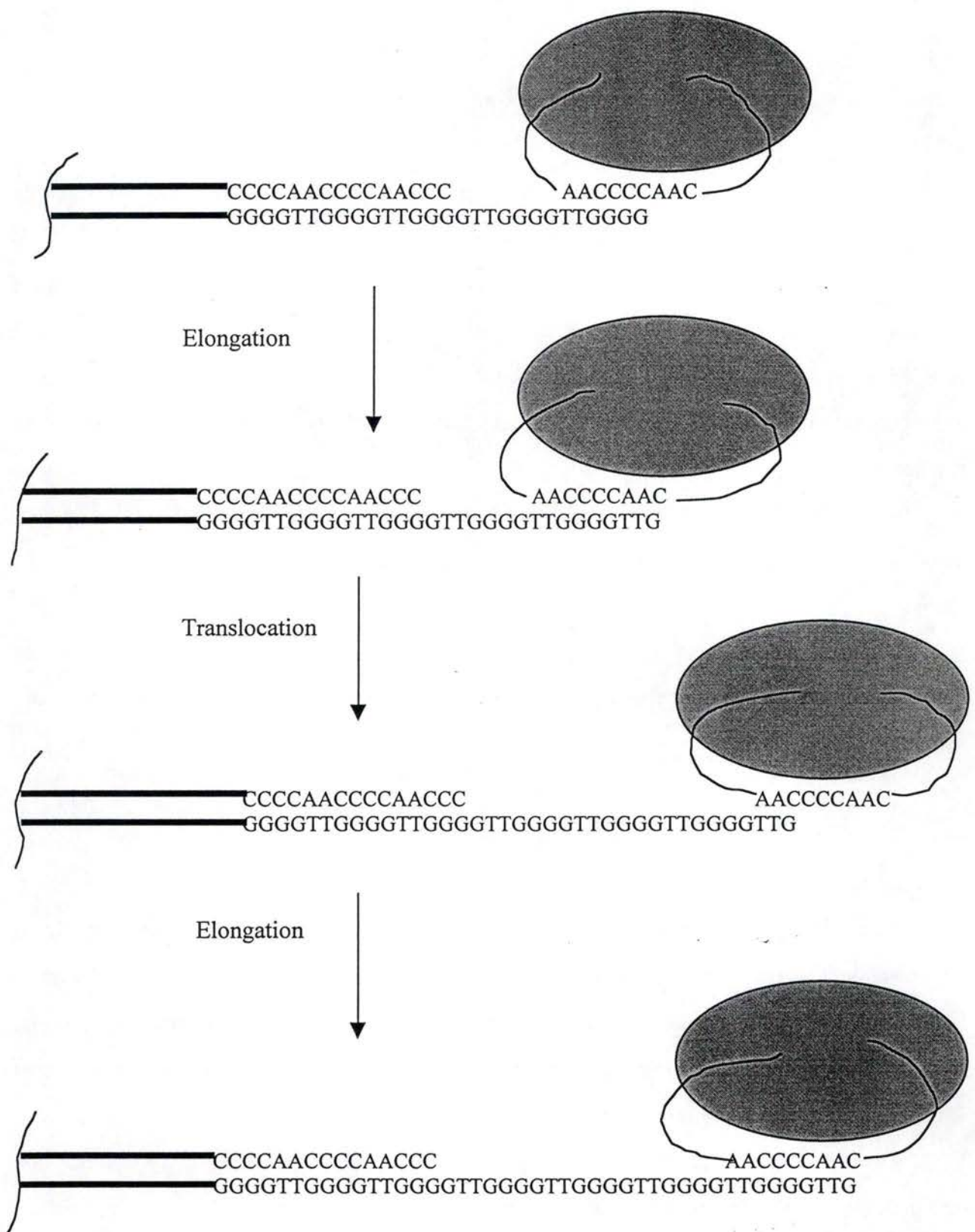


Figure I.5.) Mécanisme hypothétique de l'activité de la télomérase. Cette dernière possède une partie ARN complémentaire de la séquence consensus des télomères. Cet ARN est utilisé comme matrice pour répliquer, au cours de deux étapes répétées en boucle, la séquence télomérique perdue.

émettre l'hypothèse que ce raccourcissement télomérique serait perçu par la cellule comme un dommage à l'ADN et entraînerait dès lors l'activation d'inhibiteurs de la division cellulaire (Levy *et al.*, 1992).

Toujours est-il que certaines cellules échappent à cette restriction terminale en activant une télomérase, enzyme qui permet de reconstituer la fin des télomères selon un mécanisme hypothétique (voir figure I.5). Cette activité est présente dans les cellules cancéreuses et germinales, ce qui pourrait expliquer leur potentiel prolifératif infini (Kim *et al.*, 1994). De même, des fibroblastes normaux transfectés par un vecteur d'expression contenant la sous-unité catalytique de la télomérase voient leur potentiel prolifératif augmenter de manière significative (Bodnar *et al.*, 1998).

C.6.) Changements dans le cycle cellulaire

Les cellules sénescents sont irréversiblement bloquées en phase G1 du cycle cellulaire (Goldstein, 1990 ; Cristofalo, 1993) (pour le cycle cellulaire, voir la figure I.6.).

On accepte, en général, quatre grandes causes potentielles de l'arrêt irréversible de la croissance cellulaire chez les cellules sénescents :

a) Répression des gènes de réponses précoces

Les « early response genes » sont des facteurs de transcription régulant d'autres gènes, comme les cyclines, les Cdks, E2F (Lodish, 1999). Ces gènes constituent la première étape dans la progression du cycle cellulaire. Chez les cellules sénescents, les gènes c-fos, id-1 et id-2 ne répondent plus aux mitogènes (Campisi, 1996). Quelles en sont les conséquences ?

c-fos doit s'associer à c-jun pour former AP-1, facteur de transcription activé par des stress et des facteurs de croissance. Id-1 et -2 répriment des facteurs de transcription.

Pour c-fos, le problème se situe au niveau de son promoteur, contenant un élément « Serum Responsive Element » sensé reconnaître un « Serum Responsive Factor » activant la

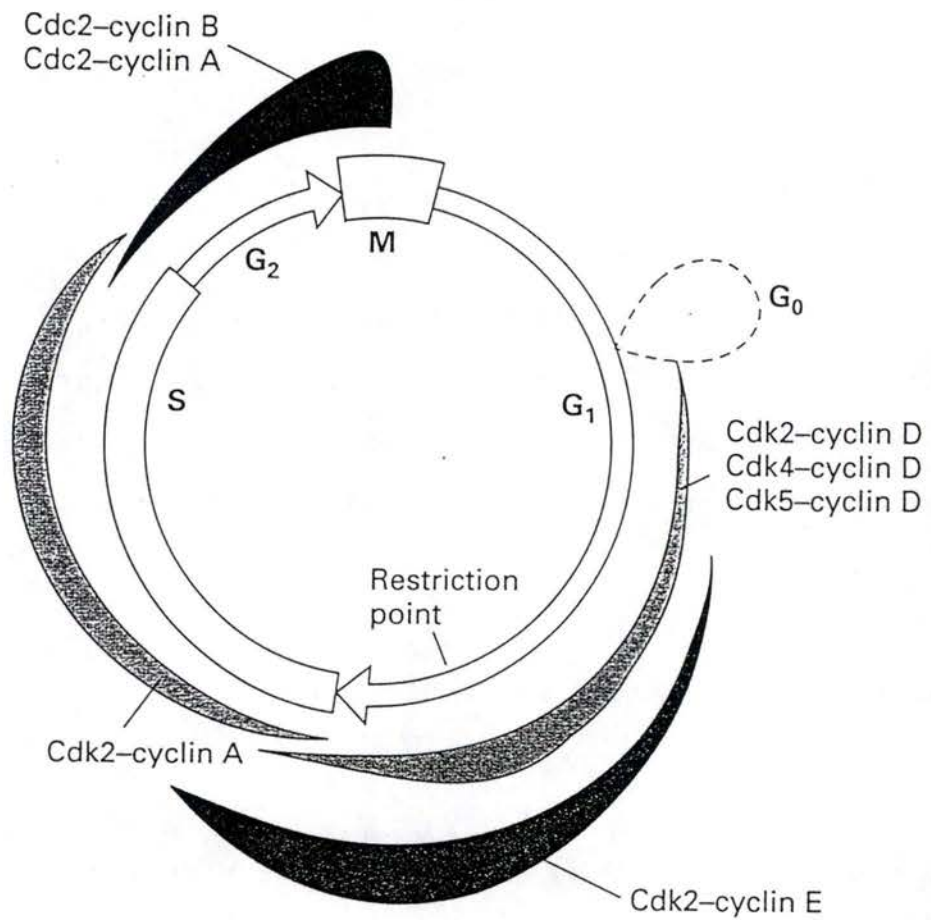


Figure I.6.) Représentation du cycle cellulaire. La régulation et la progression de celui-ci est dépendante de différents complexes Cyc-Cdk. Le “restriction point” est le moment où l’entrée de la cellule en phase S est déterminée.

transcription. Mais dans les cellules vieilles, SRF est hyperphosphorylée, ne pouvant plus se fixer à sa séquence cible (Atadja *et al.*, 1994).

Pour Id-1 et -2, le mécanisme est encore méconnu.

b.) Répression des gènes responsables de la progression du cycle vers la phase S

L'induction de divers gènes est nécessaire pour la transition de la phase G1 à la phase S, c'est le cas notamment de E2F, un facteur de transcription qui active entre autres des gènes responsables de la synthèse des nucléotides (Nevins, 1992).

Or, les cellules sénescents sont déficientes pour l'activité d'E2F (Dimri *et al.*, 1994). D'une part, il reste inactif à cause de l'hypophosphorylation de pRB (protéine de rétinoblastome) et ces deux facteurs forment alors un complexe inactif. D'autre part, la synthèse d'E2F dépend de l'activité d'un autre facteur de transcription, E2F1, et ce dernier est déficient dans les cellules âgées (Dimri *et al.*, 1994).

c.) Répression de cyclines et Cdk's

Les cyclines et Cdk's sont des enzymes qui régulent les différentes phases du cycle cellulaire (figure I.6.). Dans les cellules sénescents, on observe soit des sous-expressions (Cdk2, Cdc2), soit des disparitions d'activité (Cyc-E, Cyc-D). Une des conséquences de la répression d'E2F1 est l'absence de Cyc-A et Cdc2, qui sont nécessaires à la phase G2.

d.) Surexpression de p21

La protéine p21 inhibe l'activité de certains complexes Cyc-Cdk. Sa transcription est activée par p53 (El-Deiry *et al.*, 1993). Sa surexpression cause dans la cellule sénescence l'inactivation de plusieurs complexes Cyc-Cdk (Campisi, 1996).

C.7.) Modification de l'expression génique non directement liée au cycle cellulaire

En plus de ces altérations de l'expression de différents gènes qui régulent directement le cycle cellulaire, de nombreuses autres modifications de l'expression génétique ont été observées. Notons, par exemple, certains gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire (Murano *et al.*, 1991), des protéases (cathepsine B) (DiPaolo *et al.*, 1992), des interleukines (IL1) (Kumar *et al.*, 1992) et certains facteurs de croissance (IGF-1) (Ferber *et al.*, 1993)...

D.) Utilisation d'un test pour l'analyse de l'expression différentielle

De nombreux travaux visant à mettre en évidence des différences d'expression génétique liées au vieillissement ont été réalisés par plusieurs équipes, chacune se focalisant sur une technique d'analyse. Notons, par exemple, la technique du « differential display » utilisée par Linskens *et al.* (1995) ou la technique d'hybridation soustractive employée par Lecka-Czernik *et al.* (1996).

L'équipe du professeur E. Gonos a étudié le vieillissement cellulaire sur des fibroblastes de rats transformés par un antigène T thermosensible du virus SV-40 (lignée tsa) (Gonos, E.S., *et al.*, 1996, 1998). Ces cellules, conditionnellement immortalisées, ont une croissance infinie lorsqu'elles sont cultivées à la température permissive de 33°C. Par contre, à 39°C, elles subissent un arrêt irréversible de la croissance. Par hybridation soustractive, les ARNm des populations cultivées à 33°C et 39°C ont été comparés. Il en a résulté la mise en évidence de neuf gènes différentiellement exprimés chez les lignées tsa ayant subi un arrêt irréversible de la croissance par rapport à leurs homologues prolifératifs. La surexpression de ces gènes est bien spécifique de l'arrêt de la croissance et ne résulte pas du choc thermique. Des contrôles adéquats ont été réalisés en cultivant à 39°C des lignées transformées par un antigène T de SV-40 sauvage.

L'apolipoprotéine J, l'ostéonectine, la fibronectine, l' $\alpha 1(I)$ -procollagène, la GTP- α binding protein, SM22, SS9 et la sous-unité III de la cytochrome C oxydase sont surexprimés dans les cellules qui ont subi, par choc thermique, un arrêt irréversible de leur croissance. La sous-unité β de la phénylalanine tRNA synthétase (FRS-2) est, elle, sous-exprimée.

L'apolipoprotéine J (aussi nommée APO-J, clusterine, TRMP-2, SP-40,40 et gp80), est une protéine aux fonctions aussi diverses que nombreuses : maturation des spermatozoïdes, protection cellulaire, transport des lipides, ... Elle est cependant connue pour être surexprimée dans la maladie d'Alzheimer, où elle intervient dans la composition des plaques neuritiques (Stone, *et al.*, 1998).

Une séquence consensus de 14 bases est présente dans le promoteur de ce gène chez tous les vertébrés (Michel, *et al.*, 1997) et est reconnue par le facteur de transcription HSF1 (Heat Shock Factor 1) activé lors de stress thermiques. L'APO-J pourrait de ce fait agir en tant que chaperone (comme les HSP). Dès lors, celle-ci aurait un rôle de protection cellulaire.

La fibronectine, l'ostéonectine et l' α -I-(1)-procollagène sont des protéines de la matrice extracellulaire. La fibronectine est impliquée dans l'adhésion, l'organisation du cytosquelette, la médiation des signaux externes mitogènes et l'entretien des tissus. La surexpression de la fibronectine serait une des causes majeures des changements morphologiques observés chez les fibroblastes âgés. (Kumazaki *et al.*, 1991). On a observé dans les morphotypes âgés la présence de « fibres de stress », et la même chose se passe lorsque l'on met les cellules en présence d'un substrat enrichi en fibronectine (Corbett, 1996).

L'ostéonectine a un niveau de transcription plus élevé dans les fibroblastes humains âgés, cette surexpression est aussi observée chez les individus atteints du syndrome de Werner (Lecka-Czernik *et al.*, 1996; Murano *et al.*, 1991; Linskens *et al.*, 1995). L'ostéonectine est une protéine qui lie le calcium et qui est impliquée dans la division cellulaire. En se fixant à la matrice extracellulaire ou au PDGF, elle empêche la reconnaissance de ce dernier par son récepteur. L'ostéonectine est connue pour inhiber la mitose des cellules endothéliales et des fibroblastes (Pichler *et al.*, 1996). L'ostéonectine possède une deuxième fonction, elle contribue au remodelage

des tissus en induisant l'expression des métalloprotéases (collagénase, gélatinase, stromélysine) qui dégradent la matrice extracellulaire et les membranes basales. Ceci a été observé lors du vieillissement cutané *in vivo*, normal ou provoqué par des expositions aux UV (Giacomoni et D'Alessio, 1996).

En ce qui concerne l' $\alpha 1(I)$ -procollagène, l'augmentation de son taux de transcription conduirait à un changement des proportions des différents types de collagènes intercellulaires, modifiant alors la résistance de ces derniers à l'action de certaines collagénases.

La cytochrome c oxydase est un enzyme mitochondrial participant au transport des électrons dans la chaîne respiratoire. Une diminution de son activité a été observée durant le vieillissement dans les biopsies de muscles squelettiques humains (Lezza *et al.*, 1994). Dans ce cas-ci, l'augmentation de la transcription viserait à compenser la baisse d'activité de cet enzyme.

La « GTP- α binding protein » et SM22 sont impliqués dans la transduction du signal dépendante du calcium. La GTP- α binding protein joue un rôle vital dans l'inhibition des canaux calciques. Ceci explique l'absence de réponse aux stimulations externes dépendantes du calcium des cellules qui surexpriment ce gène (Liu *et al.*, 1994).

SM22 code pour une protéine liant le calcium. L'injection de son ARNm dans des fibroblastes jeunes provoque la suppression des courants dépendants du calcium, ce qui suggère que sa surexpression provoque la même conséquence dans les cellules vieilles (Liu *et al.*, 1994).

Pour FRS-2, la sous-unité β de l'enzyme synthétisant l'ARNt-phénylalanine, sa sous-expression est difficile à mettre en relation avec le vieillissement cellulaire. Quant au gène SS9, il code pour une protéine dont la fonction reste inconnue à ce jour.

Reprenant ces gènes, P. Dumont *et al.* ont montré leur surexpression au cours du vieillissement des fibroblastes humains WI-38 et IMR-90 (Dumont, soumis).

Devant ces résultats cités, il nous paraît donc très important de pouvoir suivre l'expression de ces gènes au cours du vieillissement normal et accéléré des cellules en culture. Ce qui est véritablement important c'est de pouvoir définir en une seule expérience le taux d'expression de l'ensemble des gènes associés au vieillissement. Avec une telle automatisation

d'analyse, les études deviendraient alors plus aisées puisque de multiples comparaisons entre les gènes eux-mêmes, et entre des cellules d'âges différents, pourraient être établies lors d'un seul test. Il existe maintenant une technique qui pourrait permettre cela : les micro-damiers à ADN.

Mais d'abord, survolons les techniques qui ont permis jusqu'à maintenant d'étudier l'expression génique, et donc les ARNm.

E.) Mise en évidence des ARNm

E.1.) Le Northern Blot

Cette technique a été décrite pour la première fois par Alwine (Alwine *et al.*, 1977; 1979). Elle se base sur le transfert d'ARN, préalablement séparés par électrophorèse, d'un gel à une membrane (soit de nitrocellulose, de nylon ou de difluorure de polyvinylidène). Cet ARN ainsi fixé est alors hybridé à différentes populations de sondes et les signaux d'hybridation donnent des renseignements quantitatifs.

La nature des sondes utilisées pour détecter l'ARN transféré sur le filtre peut être très variable : ADN double-brin marqué par nick-translation ou random priming, ADN simple-brin préparé par extension d'amorce, ...

Le grand désavantage de cette technique est la quantité importante de matériel nécessaire pour la réalisation d'un Northern Blot (20 µg). Il existe en effet des situations où il est impossible d'avoir une aussi grande quantité d'ARN.

C'est alors que d'autres techniques doivent être employées.

E.2.) La RT-PCR quantitative

Il existe d'autres techniques qui permettent une analyse quantitative d'ARN présents dans une population cellulaire, dont les RT-PCR quantitatives (Becker-André *et al.*, 1989). On en distingue principalement deux types : la RT-PCR compétitive utilisant un standard interne et la RT-PCR semi-quantitative utilisant un standard externe. Après une étape de rétro-transcription des ARNm en ADNc, on procède à une amplification par PCR. Cette technique nécessite peu de matériel de départ puisque 100 ng d'ARN total sont suffisants.

E.2.1.) La RT-PCR compétitive

Cette technique se base sur une co-amplification d'une séquence cible spécifique et d'un standard interne de concentration connue avec les mêmes amorces, le tout dans un seul tube. Le standard interne doit donc se partager la reconnaissance des amorces avec la matrice spécifique, et ils seront alors amplifiés de façon compétitive avec la même efficacité. La quantification est réalisée par comparaison du signal obtenu pour la matrice spécifique avec le signal obtenu pour le standard interne. Pour ce faire on réalise plusieurs tubes en variant la quantité de standard interne tandis que la quantité de l'échantillon est constante. Si le signal est égal pour l'échantillon et le standard, alors leur quantité originelle était identique, et puisque la quantité de standard est connue, celle de l'échantillon l'est aussi.

La partie cruciale dans cette technique est l'élaboration du standard interne.

Il faut que les différents produits PCR soient identifiables et ne puissent pas être confondus, c'est principalement une différence de taille entre le contrôle et la matrice qui permettra de les distinguer.

Les amplifications étant réalisées avec une même efficacité, une quantification rigoureuse et sûre peut-être réalisée.

E.2.2.) La RT-PCR semi-quantitative

La RT-PCR semi-quantitative se distingue de la RT-PCR compétitive par le fait qu'il n'y a plus de compétition entre le standard et la matrice spécifique. Le standard utilisé est un standard externe, il est amplifié dans un autre tube avec un couple d'amorces qui lui est propre. Les amorces du standard externe ciblent généralement un gène dont l'expression ne varie pas au cours du cycle cellulaire.

Les efficacités des PCR étant différentes, la quantification est approximative, c'est pourquoi on parle de tests semi-quantitatifs. De plus, pour être efficace, la quantification doit s'opérer à un nombre de cycles correspondant à la phase exponentielle de la PCR, qui peut être différent pour le standard et la matrice.

Toutes ces techniques demandent beaucoup de préparation, et, de plus ne mettent en évidence qu'un seul gène à la fois. Il serait utile pourtant de pouvoir en détecter une multitude simultanément. Une nouvelle technique, présentant ces avantages, peut maintenant être utilisée. C'est la technique des Biochips à ADN, l'objet de ce mémoire. Elle est décrite en détails dans les pages suivantes.

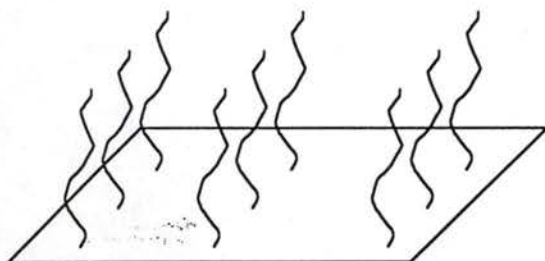
F.) Les micro-damiers à ADN

La technique des micro-damiers d'ADN est une nouvelle technique utilisée dans divers champs d'application différents : l'étude et développement de médicaments (Debouck, 1999), l'étude des cancers (DeRisi, 1996), le dosage de gènes dans la région pseudoautosomale du chromosome X dans le syndrome de Klinefelter (Geschwind, 1998), découverte et analyse des gènes associés aux maladies inflammatoires (Heller, 1997), ...

Ces dernières années ont vu un intérêt croissant pour les microdamiers. Dans le futur (2003 prévu pour le génome humain), un nombre croissant de gènes encore inconnus devront être

ADN-trappeurs fixés
de manière covalente
sur une surface.

ADN-cibles marqués.



Hybridation des ADN-cibles sur les ADN-trappeurs complémentaires.

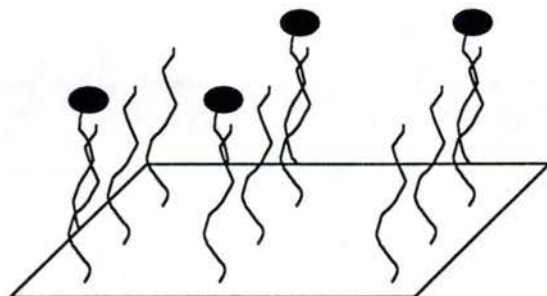


Figure I.7.) Représentation schématique du principe de l'hybridation d'ADN-cibles marqués sur des sondes, dites "trappeurs", immobilisées sur un support. Le "marquage" des ADN-cibles dépend de la méthode de détection utilisée.

analysés, et il sera nécessaire de concevoir un outil qui permettra l'exploration de ce monde encore vierge. Pour l'analyse de l'expression, pour le génotypage multiple, pour le screening de mutations ; le "Biochips" propose autant de facettes qu'il y a d'applications (Nature Genetics, supplement, volume 21, janvier 1999).

F.1.) Principe

C'est une technique basée sur l'hybridation entre une sonde (ici appelée "trappeur") et une cible (figure I.7.). Le trappeur se trouve fixé sur un support solide, comme le verre. Sur cette sonde immobile sont alors hybridés des ADN-cibles à analyser. Ces ADN-cibles hybridés spécifiquement à leurs trappeurs sont alors détectés.

Au-delà de cette simple explication se cache une technique polyvalente. De par sa miniaturisation, il est possible, sur une surface de moins d'un centimètre carré, d'analyser l'expression de centaines de gènes, puisqu'une seule sorte de trappeur peut être fixée dans une zone de quelques centaines de microns. Il est alors aisé d'élaborer un damier où chaque « spot », ou unité d'hybridation représentera un seul gène, et s'il y a cent spots, nous pourrons donc analyser cent gènes à la fois sur un seul damier d'un centimètre carré... Voir plus loin pour des explications plus détaillées sur les procédés de miniaturisation.

Pour l'analyse des résultats, de nombreuses techniques peuvent être employées : chémoluminescence, fluorescence, précipité d'argent, et même, dans le cas d'un support conducteur, par analyse de la variation de l'impédance locale, permise encore une fois par la miniaturisation.

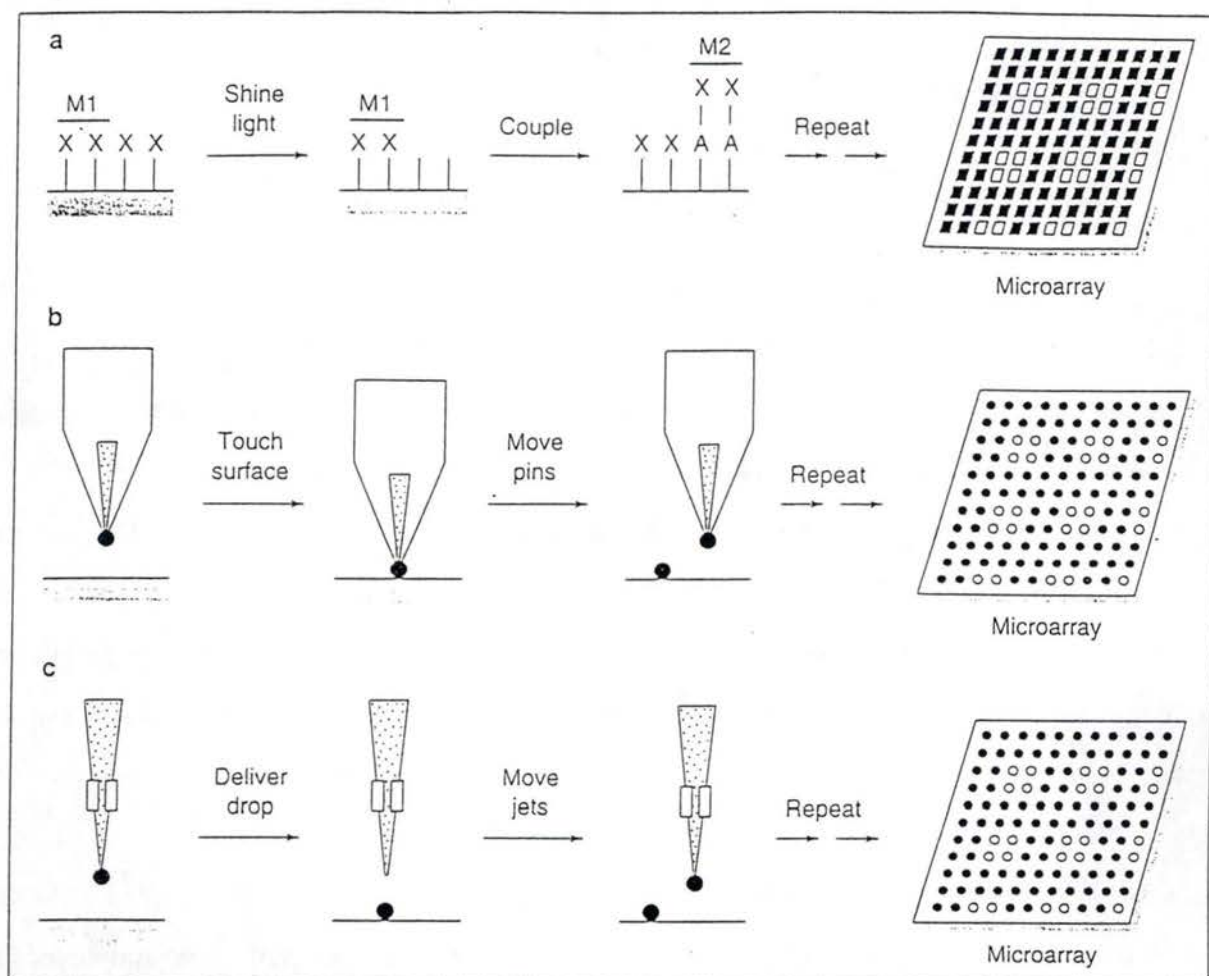


Figure I.8.) Représentation schématique des différentes technologies de dépôt des ADN-trappeurs pour l'élaboration de micro-damiers.

En a, la technique de synthèse *in situ* utilisant des groupes photoacivables et des obturateurs sélectifs.

En b, la technique de dépôt par un robot muni d'une aiguille.

En c, la technique de dépôt en utilisant la technologie des "jets d'encre".

F.1.1.) Fixation des trappeurs

a.) *Choix du support*

De nombreuses surfaces peuvent être utilisées, mais il y a néanmoins certaines propriétés qui feront l'une ou l'autre surface plus adéquate. Une surface idéale devra être bon marché, solide, non poreuse, pouvant être modifiée chimiquement en surface. Dans le cas où la détection se fera en fluorescence, le support devra posséder une faible autofluorescence. Le verre, présentant ces propriétés, est le matériau le plus répandu pour la fabrication des biochips. Certaines entreprises, comme Nanogen, utilisent un autre support tel que les microcircuits imprimés en silicium capables de conduire le courant électrique.

b.) *Méthodes d'adressage de l'ADN sur le support*

Il existe principalement deux modes d'adressage de l'ADN, la synthèse *in situ* sur le support ou le greffage après synthèse.

La méthode développée par Fodor et ses collègues (Affymetrix, Santa Clara, USA) est un exemple de synthèse *in situ*. Elle combine la photolithographie des semi-conducteurs avec la chimie de synthèse des ADN. La surface de verre possédant des groupes photolabiles est illuminée sélectivement à l'aide d'obturateurs, une zone déterminée est alors activée. La surface est immergée dans une solution d'une base d'ADN photoprotégée et cette base (A, T, G ou C) se fixera à l'endroit activé. On répète les activations sélectives puis les bains de nucléotides et ainsi de suite. Des oligonucléotides d'une séquence définie seront situés à des endroits déterminés sur la surface (Figure I.8.a.). Bien que la complexité des obturateurs soit grande, cette méthode n'est pas limitée par un adressage précis des spots.

Les chips d'Affymetrix ont une capacité de synthèse de plus de 400000 groupes de nucléotides sur une aire de $1,6 \text{ cm}^2$ et chaque groupe contient 10 millions de nucléotides d'une séquence donnée. La taille des sondes synthétisées est cependant limitée à 15-25 nucléotides.

En ce qui concerne le greffage après synthèse, différentes méthodes d'adressage existent.

Un de ces procédés est celui développé par Nanogen et Cis Bio International qui utilisent des puces informatiques en silicium où chaque plot (ou unité d'hybridation) est contrôlé par une microélectrode de platine. Celle-ci permet de faire varier de façon locale le champ électrique (Bellis *et al.*, 1997).

L'ADN étant chargé négativement, il est ici greffé sélectivement sur chaque microélectrode grâce à l'induction d'un champ électrique positif à un endroit donné. On parle alors d'adressage électronique par opposition à un adressage mécanique réalisé à l'aide d'un robot.

La méthode commercialisée par Synteni (Fremont, CA, USA) et développée par Shalon et Brown (Shalon *et al.*, 1996 ; Schena *et al.*, 1995) utilise quant à elle un procédé mécanique d'adressage. Les sondes, de l'ordre du nanolitre, sont déposées à l'aide d'un robot muni d'aiguilles (figure I.8.b.). Cette technique offre l'avantage de pouvoir fixer des fragments d'ADN de grande taille. Cependant, chaque échantillon doit être synthétisé et purifié avant le dépôt.

La puce de Synteni contient actuellement 10000 groupes d'ADNc sur une surface de $3,6 \text{ cm}^2$.

C'est ce type de dépôt qui sera utilisé pour réaliser les micro-damiers dans ce mémoire.

D'autres robots, basés sur le principe des imprimantes à "jet d'encre", ont été élaborés par Incyte Pharmaceuticals et Protogene (Palo Alto, USA) (figure I.8.c.). Cette technologie utilise la piézoélectricité ou d'autres formes de propulsion pour transférer les substances sur une surface solide.

Il existe actuellement plusieurs sociétés qui, chacune, ont développé leur propre méthode. Quelques-unes sont recensées à la figure I.9.

Table 1. Microarray Industry

Company	Contact information	Key products and services
Affymetrix	Santa Clara, CA, USA	GeneChip™ technology, microarray contract services, complete microarray systems
Alphagene	Woburn, MA, USA	AlphaGenomics™, full-length cDNAs, microarray contract services
Amersham	Amersham, UK	CyDye™ fluorescent-labelling reagents
Biodot	Irvine, CA, USA	Ink-jetting technology, microarray instrumentation
CLONTECH Labs	Palo Alto, CA, USA	Technology Access Program, gene-expression reagents
General Scanning	Watertown, MA, USA	Confocal-scanning instrumentation
Genetix	Dorset, UK	Microspotting instrumentation
Genome Systems	St Louis, MO, USA	Expressed-sequence-tag (EST) libraries
Genometrix	The Woodlands, TX, USA	Microarray technology platform, contract services
Genomic Instrumentation Services	Menlo Park, CA, USA	Development Partners Program, microarray instrumentation
Hewlett-Packard	Palo Alto, CA, USA	GeneArray™, confocal-scanning instruments (Affymetrix)
Hyseq	Sunnyvale, CA, USA	HyChip™ products, genomics platform, contract services
Incyte Pharmaceuticals	Palo Alto, CA, USA	LifeSeq™ database, GeneJet™ and GEM™ technology, microarray contract services
Intelligent Automation Systems	Cambridge, MA, USA	Custom automation, microarray instrumentation, contract work
Life Technologies	Gaithersburg, MD, USA	Fluorescent-labelling reagents
Molecular Applications Group	Palo Alto, CA, USA	GeneMine Pro™, data-analysis and -visualization software
Molecular Dynamics	Sunnyvale, CA, USA	Microarray Technology Access Program, complete microarray systems
Nanogen	San Diego, CA, USA	APEX™, electronic microarray technology, contract services
Norgren Systems	Palo Alto, CA, USA	CCD-based imaging, microspotting instrumentation
OncorMed	Gaithersburg, MD, USA	Cancer prognostics and diagnostics
Pangea Systems	Oakland, CA, USA	GeneWorld™, data-mining, -analysis and -management software
Protogene Laboratories	Palo Alto, CA, USA	Ink-jetting technology, microarray contract services
Qiagen	Hilden, Germany	DNA- and RNA-purification systems
Research Genetics	Huntsville, AL, USA	GenePairs™, primers and purified PCR products
Silicon Graphics	Mountain View, CA, USA	Computational hardware and software, data-visualization and -mining tools
Synteni	Fremont, CA, USA	GEM™ technology, microarray contract services
TeleChem International	San Jose, CA, USA	ArrayIt™, PCR purification systems, microspotting technology, scanners

Figure I.9.) Industries impliquées dans le développement des microdamiers. Cette liste n'est pas exhaustive.

c.) Formation de la liaison entre l'ADN et le support

La liaison dépend du type de support, le verre n'ayant pas la même réactivité de surface que l'or ou le silicium. Bien souvent il faudra au préalable fonctionnaliser le support avec les fonctions qui permettront la formation du lien.

Diverses méthodes de couplage non covalents sont couramment utilisées pour fixer l'ADN sur du verre telles que des interactions électrostatiques par l'intermédiaire d'un coating de polylysine (Schena *et al.*, 1995) ou des interactions hydrophobes (Allemand *et al.*, 1997). Cependant, l'ADN peut se détacher de la surface à température et force ionique élevées, conditions requises pour mener à bien l'hybridation. De plus, l'ADN est souvent attaché sur toute sa longueur et est donc moins accessible pour l'hybridation.

L'immobilisation covalente de l'ADN par une des extrémités est dès lors préférée car dans cette configuration la totalité de sa séquence est accessible pour l'hybridation.

Ainsi de l'ADN carboxylé peut être immobilisé sur du verre aminé en présence de carbodiimide (Joos, 1997) ; de l'ADN aminé peut être lié à du verre activé par de l'isothiocyanate (Guo, 1994), par des groupes époxydes (Lamture, 1994) ou par des aldéhydes (Schena, 1996). Cette dernière méthode a retenu notre attention car elle est rapide et ne nécessite pas d'agent de couplage.

De plus, des lames de verre fonctionnalisées avec des aldéhydes sont disponibles dans le commerce.

On viendra fixer sur ces lames de verre portant des fonctions aldéhydes des ADN portant un groupe amine à leur extrémité 5'.

F.1.2.) Le choix des cibles

Dans le cas qui nous intéresse, c'est-à-dire l'analyse de l'expression de gènes lors du processus du vieillissement, les cibles seront l'ensemble des ARN messagers ou totaux synthétisés

dans des fibroblastes humains cultivés sous certaines conditions. Les ARN messagers extraits seront rétrotranscrits en ADNc marqués constituant les cibles qui seront hybridées sur le damier. Les profils d'expression seront comparés entre des cellules jeunes et des cellules présentant un phénotype agé.

F.1.3.) Les moyens de détection

La fluorescence est le mode de détection le plus utilisé. Cependant d'autres méthodes peuvent être envisagées telles que la chémoluminescence où l'on mesure l'émission de photons à partir d'un enzyme en présence de son substrat ; la colorimétrie où l'on mesure l'intensité de la couleur de la solution due à l'activité d'un enzyme sur un substrat ; la bioluminescence où l'enzyme employé est la luciférase et où l'on mesure également l'émission de photons ; la radioactivité ; la précipitation de sels d'argent catalysée par une particule d'or ; la mesure d'un signal électrique....

Dans tous les cas, il faut que la détection présente des caractéristiques indispensables :

- sensibilité : il faut pouvoir détecter la présence d'un nombre très faible d'hybrides, car certains échantillons seront très pauvres en cibles, par exemple dans un échantillon d'ADNc où l'on désire mettre en évidence la présence d'un ARN « low-copy »,
- pratique : la méthode devra être simple à l'emploi et à la détection,
- bruit de fond faible : pour la finesse de la détection il est primordial que la méthode possède une très faible capacité à émettre un bruit de fond, la détection ne devant émettre un signal qu'à l'endroit d'une hybridation,
- bon marché : la technique de détection, pour un usage polyvalent et généralisé, devra être abordable pour n'importe quel utilisateur.

La détection par précipité d'argent sera celle retenue dans ce mémoire, car elle présente tous les avantages cités ci-dessus.

G.) Objectifs

Ce mémoire sera consacré au développement d'un microdamier à ADN, encore appelé biochips, qui sera utilisé pour l'analyse de l'expression génique de cellules humaines au cours du vieillissement cellulaire.

La technique du Biochips permet la détection simultanée de plusieurs molécules d'acides nucléiques présentes dans un échantillon. Elle consiste en l'hybridation de molécules d'ADN « cibles » sur des sondes trappeurs immobilisées sur un support solide comme le verre. Les zones d'hybridations sont fortement restreintes, de l'ordre d'une centaine de micromètres, ce qui permet de réaliser des damiers relativement petits en surface mais contenant un grand nombre de "spots", chacun mettant en évidence un seul gène. Lorsque les gènes seront définis, un seul damier d'à peine quelques millimètres carrés servira à analyser l'expression différentielle des gènes au cours du vieillissement cellulaire.

L'expression des gènes se fera à partir de fibroblastes humains cultivés dans des conditions bien précises, que nous lyserons pour en extraire l'ARN total. Une étape de rétrotranscription nous donnera des ADNc marqués, et cette population d'ADNc sera utilisée comme cible, hybridée sur les chips.

Dans un premier temps, nous procéderons à la fabrication des microdamiers spécifiques au vieillissement comportant les gènes mis en évidence par l'équipe de E. Gonos (Gonos *et al.*, 1998) comme étant exprimés différemment en fonction de l'âge de la cellule. Ces gènes sont la sous-unité III de la cytochrome c oxydase, la GTP binding protein, l'ostéonectine, la fibronectine, SS9, FRS-2, l'apolipoprotéine-J, SM22 et l' α -I-(1) procollagène.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

A.) Préparation d'ADN plasmidique

A.1.) Principe

Des bactéries *E.coli* Sure (Stratagene, USA) ont été transformées par les plasmides Bluescript SK (voir la figure II.1. pour une description du plasmide) contenant les inserts des neuf gènes de l'équipe de E. Gonos (Gonos *et al*, 1998). Pour chacun des gènes, le stock se compose de deux fioles conservées à -80°C dans 30 % de glycérol.

Dans une première étape, les bactéries ont été remises en culture afin de produire les plasmides contenant les 9 gènes.

A partir de cultures de 5 ml en milieu LB additionné d'ampicilline, les plasmides ont été extraits suivant la technique de minipréparation d'ADN plasmidique (Ausubel *et al.*, 1987).

La préparation des plasmides a été réalisée au moyen du Kit Miniprep mis au point par Qiagen (Chatsworth, USA). Elle se base sur la lyse alcaline des bactéries et la précipitation sélective des protéines, débris cellulaires et ADN génomique.

A.2.) Matériel

<i>Milieu d'enrichissement</i>	Luria Bertani (LB) Hydrolysate de caséine (peptone) (GIBCO, Gaithersburg, USA) : 1 % NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne) : 0,5 % Extrait de levure (Difco, Detroit, USA) : 0,5 % Ampicilline (Sigma, St Louis, USA)
<i>Isopropanol</i>	Merck, Darmstadt, Allemagne
<i>Ethanol</i>	Merck, Darmstadt, Allemagne
<i>Tampon P1</i> (resuspension) (Stock à 4°C)	RNAse A 100 mg/ml Tris-HCl 50 mM EDTA 10 mM (Qiagen, Chatsworth, USA)
<i>Tampon P2</i>	NaOH 200 mM

<i>(Lyse)</i> <i>(Stock à T° ambiante)</i>	SDS 1% (Qiagen, Chatsworth, USA)
<i>Tampon P3</i> <i>(Neutralisation)</i> <i>(Stock à 4°C)</i>	KAc 3,0 M, pH 5,5 (Qiagen, Chatsworth, USA)

A.3.) Méthode

- 1- Inoculer 5 ml de milieu de culture LB liquide additionné d'ampicilline en concentration finale de 100 µg/ml.
- 2- Laisser incuber la nuit à 37°C sous agitation (250 RPM).
- 3- Centrifuger 1,5 ml de la culture dans un tube Eppendorf pendant 5 min à 15000 RPM (Heraeus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379, Hanau, Allemagne) à température ambiante et éliminer le milieu de culture.
- 4- Resuspendre le culot dans 300 µl de tampon P1 additionné de RNase A.
- 5- Ajouter 300 µl de P2, agiter et incuber 5 minutes à température ambiante.
- 6- Ajouter 300 µl de P3 à 4°C, agiter et incuber 20 minutes sur glace. Ce faisant, les protéines, ADN génomique et débris cellulaires sont précipités.
- 7- Centrifuger 15 min à 15000 (12000) RPM (Heraeus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379, Hanau, Allemagne) à 4°C et récupérer le surnageant.
- 8- Ajouter au surnageant 0,8 volume d'isopropanol pour précipiter l'ADN, agiter doucement pour homogénéiser.
- 9- Centrifuger 15 min à 4°C, 15000 RPM (Heraeus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379, Hanau, Allemagne) et éliminer le surnageant.
- 10- Laver l'ADN en ajoutant 300 µl d'éthanol 70 % (-20°C) et centrifuger 15 min à 15000 RPM, 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1379, Hanau, Allemagne).
- 11- Enlever l'éthanol et sécher sous vide (Heto Vac, Analyis, Belgique).
- 12- Resuspendre le culot dans 20 µl d'eau désionisée stérile.

B.) Estimation de la quantité et de la pureté d'ADN

B.1.) Principe

L'estimation se fait par spectrophotométrie. Le spectrophotomètre (Genequant II, Pharmacie Biotech, Cambridge, Angleterre) nous donnera la densité optique (DO) de la solution d'ADN. La mesure de la DO à 260 nm permettra de calculer la concentration en acides nucléiques grâce à la formule :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{DO} \times 50 \times \text{dilution.}$$

50 signifie que pour une $\text{DO}_{260 \text{ nm}}$ égale à 1, la concentration en ADN est de 50 $\mu\text{g/ml}$.

Pour avoir une idée de la pureté de la solution d'acides nucléiques on réalise également une lecture à 280 nm, ce qui va déterminer la présence dans l'échantillon de protéines, de phénols...

En effectuant le rapport $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ on obtient un rapport, qui pour des préparations pures doit se situer entre 1,7 et 1,9.

B.2.) Protocole

- 1- Diluer un aliquot de la solution d'ADN à quantifier dans de l'eau distillée stérile (entre 10 et 20 fois).
- 2- Nettoyer la cuvette avec du NaOH 0,1 N et la rincer trois fois avec de l'eau distillée.
- 3- Déposer au fond de la cuvette (minimum 70 μl) de l'eau distillée stérile et faire un blanc.
- 4- Déposer au fond de la cuvette (minimum 70 μl) la dilution d'ADN et effectuer la mesure des absorbances à 260 nm et 280 nm.

C.) Restriction d'ADN

C.1.) Principe

Les endonucléases de restriction sont des enzymes reconnaissant et clivant des séquences spécifiques (en général de 4 à 6 pb) au niveau de l'ADN bicaténaire. Il est alors possible de déterminer la présence ou non d'un insert dans le plasmide : la carte des sites de restrictions est fournie par la firme qui produit le plasmide, il reste à choisir une ou plusieurs enzymes qui en coupant à leurs sites spécifiques permettront ainsi un diagnostic simple par analyse de la taille des fragments obtenus lors d'une électrophorèse sur gel d'agarose.

C.2.) Matériel

Enzyme de restriction	Séquence cible	Tampon 10X
Pvu II (Promega, Madison, USA) (37°C)	5'-CAG/CTG-3'	B (Promega, Madison, USA)
EcoRI (Promega, Madison, USA) (37°C)	5'-G/AATTC-3'	H (Promega, Madison, USA)

C.3.) Protocole

- 1- Déposer 1 à 4 µg d' l'ADN plasmidique dans un tube Eppendorf.
- 2-Ajouter 2 µl de tampon 10 x adéquat.
- 3-Ajouter l'enzyme à raison de 2 à 10 unités par µg d'ADN à restreindre.
- 4-Porter à un volume de 20 µl avec de l'eau distillée.
- 5-Incuber 1 heure à 37°C.
- 6-Arrêter la réaction en ajoutant de l'EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne) à une concentration finale de 10 mM pH 8.

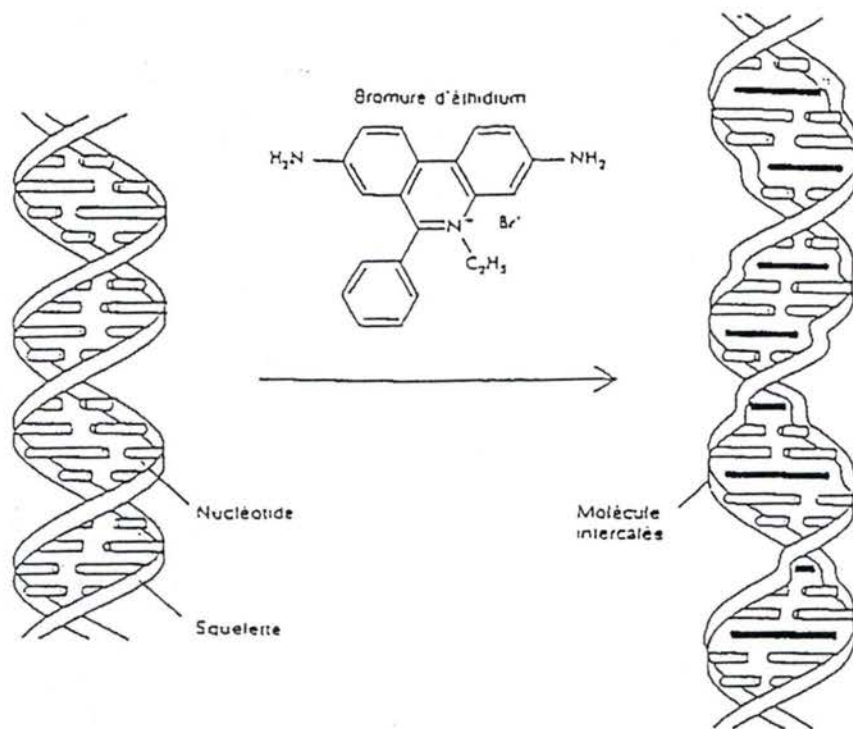


Figure II.2.) Localisation du bromure d'éthidium dans la double hélice de l'ADN. (Watson *et al.*, 1989)

D.) Electrophorèse sur gel d'agarose

D.1.) Principe

L'électrophorèse en gel d'agarose est une technique qui permet la séparation des fragments d'ADN sur base de leur taille. Un courant traverse le gel en emportant avec lui les ADN chargés négativement plus ou moins rapidement selon leur taille (les plus grands seront davantage retenus par le gel).

Selon les tailles des ADN à séparer, il est recommandé d'adapter la concentration en agarose du gel :

<i>Tailles des ADN attendus (Kb)</i>	<i>Concentration en agarose (%)</i>
5 - 60	0,3
1 - 20	0,6
0,8 - 10	0,7
0,5 - 7	0,9
0,4 - 6	1,2
0,2 - 3	1,5
0,1 - 2	2,0

L'ADN est marqué au bromure d'éthidium. Cette molécule fluorescente s'intercale entre les bases de la double hélice d'ADN (Figure II-2). Les bandes d'ADN deviennent visibles par illumination aux ultraviolets. L'intensité de la bande est directement proportionnelle à la quantité d'ADN.

Les tailles sont déterminées par corrélation avec un marqueur de poids moléculaire composé de fragments d'ADN de tailles connues et déposé sur le gel en même temps que les échantillons à analyser

De plus, pour certains de ces marqueurs de poids moléculaire, non seulement les tailles sont connues, mais également les concentrations en ADN des différentes bandes. Ceci permet par comparaison d'intensité d'avoir une idée de la concentration d'ADN de

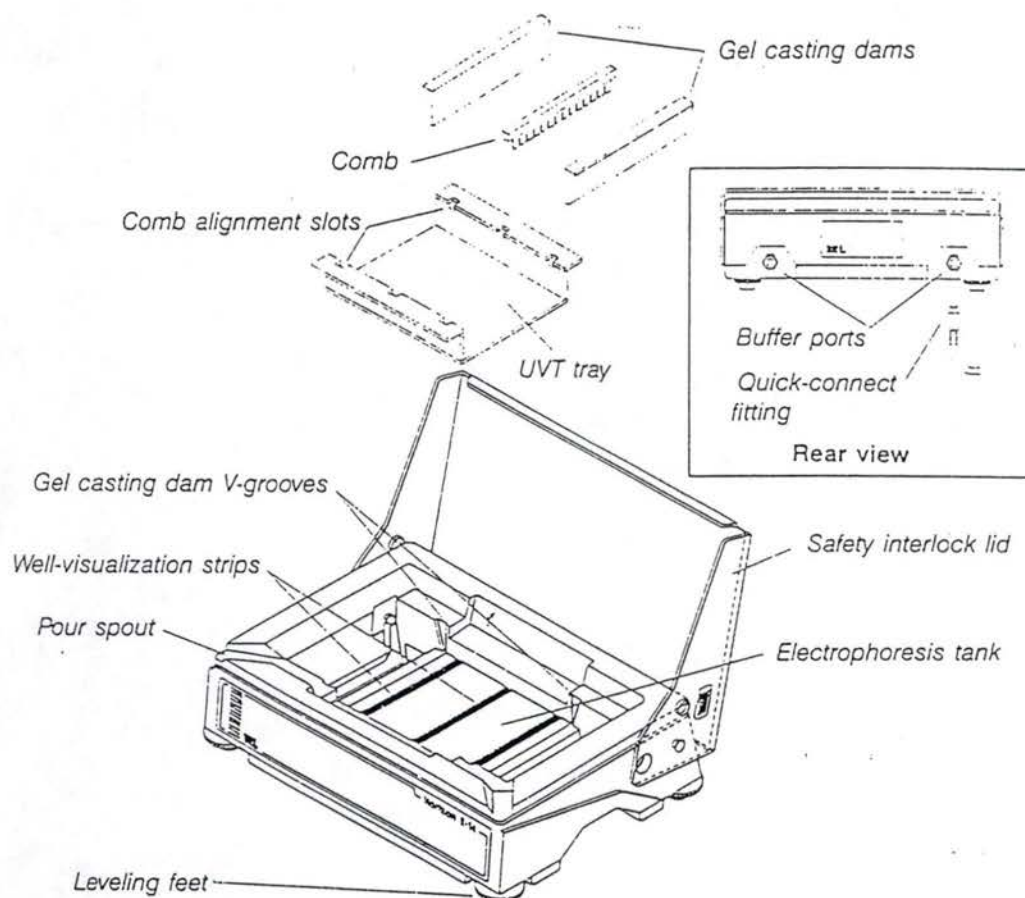


Figure II.3.) Représentation schématique représentant l'appareil d'électrophorèse Horizon™BRL.

l'échantillon. En général, on effectue plusieurs dilutions de la solution d'ADN que l'on veut quantifier pour pouvoir vérifier les estimations.

D.2.) Matériel

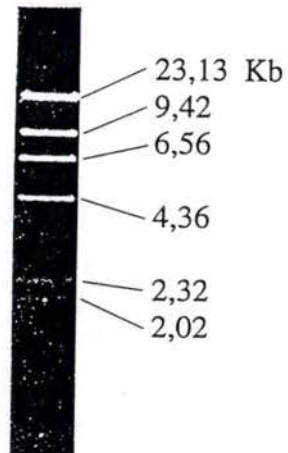
<i>Cuve à électrophorèse</i>	Horizon® 11-14, GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, USA). (Figure II.3.)
<i>TBE 1x</i>	Stock TBE 10 x (Gibco BRL, Gaithersburg, USA). Préparation pour 1 litre : - 108 g de Tris-HCl (Merck, Darmstadt, Allemagne). - 55 g d'acide borique (Merck, Darmstadt, Allemagne). - 7,5 g EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne).
<i>Agarose</i>	Gibco BRL, Gaithersburg, USA.
<i>Bromure d'éthidium</i>	Stock 500 µg/ml (Sigma, St Louis, U.S.A.)
<i>Tampon d'échantillon</i>	-Glycérol 50 % (Merck, Darmstadt, Allemagne). -EDTA 100 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne). -SDS 1 % (Merck, Darmstadt, Allemagne). -Bleu de bromophénol 0,1 % (Acros, Geel, Belgique)
<i>Marqueurs ADN</i>	-Marqueur I, IV (Eurogentec, Seraing, Belgique). -Smart Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgique). -Low DNA Mass Ladder (Gibco, Gaithersburg, USA). (Figure II.4.)
<i>Source d'UV</i>	Transilluminateur, 302 nm, Analis, Namur, Belgique.
<i>Appareil photographique</i>	Polaroïd modèle 44-16 MP4 Instant Camera System, U.S.A.
<i>Film</i>	Duofilm, 667 Iso 3000/36°C, (Janssens Chimica, Beerse, Belgique)

D.3.) Protocole

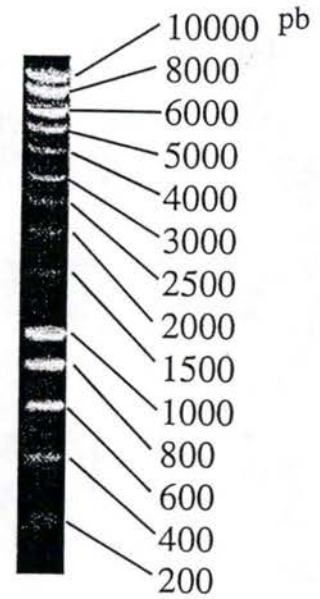
1-Porter à ébullition 100 ml de tampon TBE 1 x contenant la quantité désirée d'agarose jusqu'à ce que l'agarose soit dissout.

2- Laisser refroidir jusqu'à 65°C. Ajouter le bromure d'éthidium pour obtenir une concentration finale de 2 µg/ml.

Marqueur I



Smart Ladder



Low DNA Mass Ladder

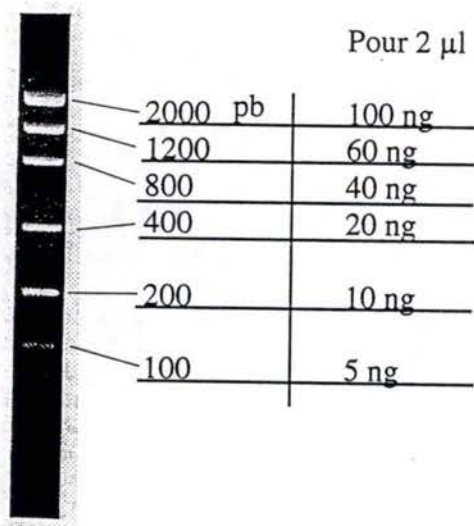


Figure II.4.) Marqueurs de poids moléculaire.

- 3- Couler le gel sur le support en plexiglas.
- 4- Placer le peigne et laisser polymériser 30 min à une heure.
- 5- Retirer le peigne et placer le gel et son support dans la cuve remplie de tampon TBE 1 x.
- 6-Déposer dans les puits les échantillons d'ADN additionnés de tampon d'échantillon. Laisser migrer les échantillons à 100 volts jusqu'à ce que la séparation des fragments d'ADN soit satisfaisante.
- 7- Illuminer le gel avec des UV (Transilluminateur).

E.) Polymerase chain reaction (PCR)

Une seconde manière de vérifier la présence des inserts dans les préparations de plasmides obtenues est de réaliser une PCR sur ceux-ci.

E.1.) Principe

L'ADN se présente sous la forme d'une double hélice anti-parallèle dont les deux brins constitutifs sont reliés par des ponts hydrogènes.

La PCR permet, à l'aide de deux amorces spécifiques d'amplifier sélectivement une séquence d'intérêt (Voir figure II.5.).

Ces amorces sont deux morceaux courts d'ADN qui sont complémentaires des extrémités de la séquence à amplifier. Lorsque l'ADN est dénaturé, ces amorces vont se lier chacune sur leur brin complémentaire. A ce moment intervient une enzyme, l'ADN polymérase qui va synthétiser à partir de l'extrémité 3' de l'amorce le monobrin qui la prolonge en se servant du brin existant comme matrice. La découverte d'une ADN polymérase bactérienne thermorésistante (*Thermus aquaticus*) permet cette élongation à haute température. A la suite de cette élongation, on obtient un nouveau brin d'ADN anticomplémentaire de la matrice. Ces étapes sont répétées un grand nombre de fois, les brins construits précédemment servant de matrice pour les prochaines élongations.

Un cycle de PCR se scinde en trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation. La dénaturation est la séparation par la chaleur des deux brins d'ADN, elle se fait habituellement à 94°C. Cette dénaturation permet dans une seconde étape aux amorces de

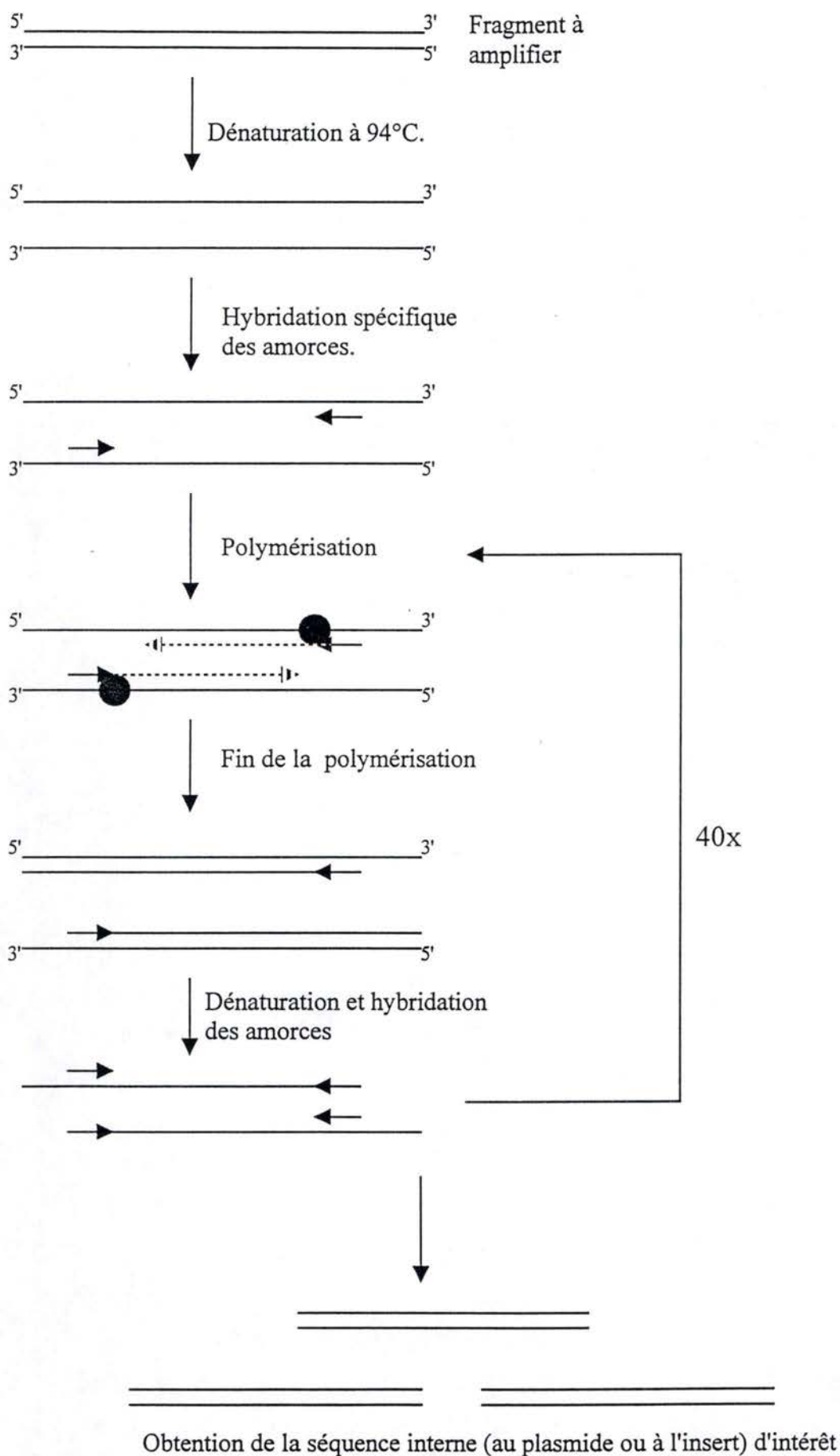


Figure II.5.) Mécanisme de la PCR. Il faut plusieurs cycle pour obtenir la séquence interne désirée, les cycles suivants sont pour l'amplification de cette séquence.

venir se fixer sur les monobrins. La température d'hybridation (T_h) des amorces peut-être calculée à partir de leur température de melting (T_m) selon l'équation :

$$T_h : T_m - 5^{\circ}\text{C} \text{ avec } T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

(Wetmur, 1991)

La température et le temps d'hybridation sont deux paramètres qui déterminent la spécificité de la réaction.

Les amorces étant fixées spécifiquement, l'élongation peut commencer. Durant cette étape, la polymérase va synthétiser le brin manquant à partir de la matrice. Cette étape se déroule à 72°C . Cette température varie selon l'enzyme utilisée. La durée de cette étape est fixée par la taille de l'amplicon (la séquence à amplifier) par rapport à la capacité d'élongation de la polymérase (dNTP incorporés/min).

Le nombre de cycles, c'est-à-dire le nombre de répétitions des trois étapes est variable, mais on veillera à ne pas dépasser 45 cycles, car il y a un effet d'épuisement des constituants de la PCR.

Le temps d'élongation du dernier cycle est fortement prolongé pour laisser à la polymérase le temps de terminer toutes les synthèses inachevées, soit 10 min.

a) La polymérase

Il existe actuellement différentes sortes d'ADN polymérases thermostables répondant chacune à des demandes particulières : la taille des amplicons, la fidélité requise,... Ici, le choix s'est porté sur l'AmpliTaq Gold de Perkin Elmer (Foster City, USA).

b.) Les amorces

Le choix des amorces est crucial pour l'amplification spécifique de la séquence d'intérêt. En général, des amorces de plus ou moins 20 bases permettent une bonne spécificité. Pour l'amplification des inserts clonés dans le plasmide Bluescript SK (Stratagene, USA), nous avons utilisé les amorces M13 « forward » et « reverse » se situant dans la région du site de clonage (voir figure II-1). Pour l'amplification d'une séquence **à l'intérieur** de l'insert, le choix des amorces est laissé à notre libre-arbitre. Les amorces doivent avoir des températures

de melting (T_m) identiques ou très proches avec un contenu en G+C compris entre 40 et 60 %. Il est également important que les amorces ne forment pas de dimères entre elles, ni ne contiennent en leur sein des régions anticomplémentaires qui entraîneraient la formation de boucles (loops, hairpins). Ces dimères et boucles diminuent l'efficacité de la PCR. Pour cela, les programmes informatiques "amplify 1.2" et "Oligo 4.0" ont été utilisés afin de sélectionner des amorces présentant toutes les qualités requises.

c.) Hot start

Avant le démarrage de la PCR, l'amplitaq Gold est inhibée, à basse température, par un inhibiteur spécifique. Cela prévient la formation prématurée d'éventuelles amplifications non spécifiques. Les cycles d'amplification sont donc précédés d'une étape d'activation de la polymérase (10 minutes à 94 °C) au cours de laquelle l'inhibiteur est désactivé (Hot Start). Cette première étape est aussi destinée à dénaturer l'ADN matrice.

d.) Utilisation du diméthylsulfoxyde (DMSO)

Le diméthyl sulfoxyde est un agent dénaturant utilisé quand on veut réduire les hybridations non spécifiques et structures secondaires indésirables de l'ADN.

Nous avons réalisé nos PCR en présence de 2 % de DMSO.

E.2.) Matériel

<i>Tampon 10x</i>	Buffer II, Perkin Elmer (Foster City, USA)
<i>Solution de $MgCl_2$ (25 mM)</i>	Perkin Elmer (Foster City, USA)
<i>DNTP (20 μM)</i>	Eurogentec (Seraing, Belgique)
<i>DMSO</i>	Janssens Chimica (Beerse, Belgique)
<i>Amorces</i>	Eurogentec (Seraing, Belgique)
<i>Taq (5U/μl)</i>	Perkin Elmer (Foster City, USA)
<i>Appareil</i>	Gene amp 9700 Perkin Elmer (Foster City, USA)

E.3.) Protocole

1- Pour une réaction PCR de 100 µl, préparer dans un microtube le mélange suivant:

- 10 µl tampon 10 x
- MgCl₂ : 25 mM
- dNTP : 200 µM
- Amorces M13 « forward » et « reverse » : 1 µM chacune
- DMSO : 2%
- AmpliTaq : 2,5 U (en dernier)

2- Ajouter 100 ng de plasmides (matrice).

3- Placer le microtube dans l'appareil préalablement programmé et démarrer la réaction. Le tableau ci-dessous reprend le programme utilisé lors de l'amplification des inserts avec les amorces M13 « forward » et « reverse » :

	Amplification des inserts
<i>Tailles</i>	0,9 – 1,8 Kb
<i>Nombre de cycles</i>	40
<i>Hot start</i>	94°C 10'
<i>Dénaturation</i>	94°C 30''
<i>Hybridation</i>	56°C 45''
<i>Elongation</i>	72°C 2'
<i>Terminaison</i>	72°C 10'

4- Conserver les produits à 4°C.

F.) Maxi-préparation de plasmides

Des stocks de plasmides ont été constitués en réalisant des préparations plasmidiques sur des cultures de volume important.

Cette préparation se fait à l'aide du Kit Maxiprep de Qiagen (Chatsworth, USA).

F.1.) Matériel

Une partie du matériel est identique à celui utilisé pour les mini-préparations d'ADN plasmidiques et est donc écrite au point A.2. de ce chapitre.

<i>Tampon QBT</i> (Equilibration)	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % isopropanol 0,15 % Triton x-100 (Qiagen, Chatsworth, USA)
<i>Tampon QC</i> (lavage)	1,0 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % isopropanol (Qiagen, Chatsworth, USA)
<i>Tampon QF</i> (Elution)	1,25 M NaCl 50 mM Tris HCl, pH 8,5 15 % isopropanol (Qiagen, Chatsworth, USA)

F.2.) Méthode

- 1- Inoculer, dans un Erlenmeyer de 1 litre, 100 ml de milieu de culture LB liquide contenant 100 µg/ml d'ampicilline.
- 2- Incuber la nuit à 37°C sous agitation (250 RPM).
- 3- Centrifuger l'entièreté de la culture 15 minutes à 6000 RPM (Beckmann, centrifuge j21-b model, rotor 2817, Analys, Namur, Belgique)
- 4- Emliminer le milieu de culture et resuspendre le culot dans 10 ml de tampon P1 additionné de RNaseA.
- 5- Ajouter 10 ml de P2, mélanger et incuber 5 minutes à T° ambiante.
- 6- Ajouter 10 ml de P3, à 4°C. Mélanger et incuber sur glace pendant 20 minutes.
- 7- Centrifuger 30 minutes à 12000 RPM, 4°C (Beckmann, centrifuge j21-b model, rotor 2817, Analys, Namur, Belgique). Récupérer le surnageant.
- 8- Pendant la centrifugation, équilibrer une colonne de type 500, livrée avec le Kit, avec 10 ml de tampon QBT.

- 9- Déposer le surnageant de l'étape n°7 sur la colonne. Le plasmide est retenu dans la colonne et le liquide qui s'écoule est éliminé.
- 10- Laver 2x la colonne avec 30 ml de tampon QC.
- 11- Eluer le plasmide avec 15 ml de tampon QF. Le plasmide est récupéré dans un tube Corex (USA) de 30 ml.
- 12- Ajouter 0,8 volume d'isopropanol, mélanger et centrifuger 30 minutes à 4°C, 12000 RPM (Beckmann, centrifuge j21-b model, rotor 2314, Analis, Namur, Belgique).
- 13- Eliminer le surnageant et laver le culot avec 5 ml d'éthanol 70% à T° ambiante. Centrifuger 15 minutes à 9500 RPM (Beckmann, centrifuge j21-b model, rotor 2314, Analis, Namur, Belgique).
- 14- Eliminer l'éthanol et sécher le culot à l'air libre. Resuspendre le culot dans 500 µl d'eau désionisée stérile.
- 15- Quantifier au spectrophotomètre comme décrit au point 2 de ce chapitre.

G.) Séquençage

Afin de produire les cibles et les trappeurs nécessaires à l'élaboration du biochips, les inserts ont été séquencés.

G.1.) Principe

La technique utilisée est un séquençage à fluorescence par PCR réalisé avec le kit « ABI.PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit » (Perkin Elmer, Foster City, USA).

Sur le fragment à séquencer, est effectuée une « PCR » avec une seule amorce à la fois (sens ou antisens). L'amorce sens dans un premier tube et l'amorce antisens dans un second. Le mix PCR contient un mélange de nucléotides terminateurs marqués par un agent fluorescent comme la fluorescéine ou la rhodamine qui bloquent l'élongation quand ils sont insérés dans l'amplicon, et des nucléotides non marqués permettant l'élongation.

La réaction PCR produit un ensemble d'amplicons de tailles variables et terminés par un nucléotide fluorescent. Cette population est déposée sur un gel d'acrylamide résolutif à la base près et les fragments sont séparés suivant leur taille. Un laser passe alors sur le profil de

migration et excite les marqueurs qui émettent en réponse sous une autre longueur d'onde qui leur est propre. Par analyse de la succession des émissions, la séquence de l'amplicon est déterminée.

G.2.) Matériel

<i>Appareil PCR</i>	Gene amp 9700 (PE)
<i>Mix PCR</i>	Ready Reaction Mix contenant la polymérase, les dNTP, les dNTP terminateurs et le tampon. Perkin Elmer (Foster City, USA)
<i>Ethanol</i>	(Merck, Darmstadt, Allemagne)
<i>Appareil de lecture de gel</i>	ABI.PRISM. Perkin Elmer (Foster City, USA)
<i>Programme de recherche informatique de séquences</i>	Blast NCBI disponible sur : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast ?Jform=0
<i>Acétate de sodium</i>	(Merck, Darmstadt, Allemagne)

G.3.) Protocole

- 1- Placer dans un tube PCR 100 à 150 ng de matrice à séquencer.
- 2- Ajouter 3,2 pmoles d'amorce sens ou anti-sens.
- 3- Ajouter 4 µl de Ready Reaction Mix et compléter avec de l'eau distillée pour obtenir un volume total de 10 µl.
- 4- Réaliser 25 cycles :
 - Dénaturation 96°C, 10 secondes
 - Hybridation 50°C, 5 secondes
 - Elongation 60°C, 4 minutes

G.4.) Purification

- 1- Pour chaque réaction de séquençage, préparer un Eppendorf de 1,5 ml contenant 25 µl d'éthanol 95%, 1 µl de NaAc 3M pH 4,6 ou 5,2 à température ambiante.
 - 2- Ajouter les 10 µl de la PCR à ce mélange. Agiter fortement et placer sur glace 10 minutes.
 - 3- Centrifuger 30 minutes à 15000 RPM, 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379, Hanau, Allemagne).
 - 4- Eliminer le surnageant. Laver le culot avec 250 µl d'éthanol 70 % à température ambiante.
 - 5- Centrifuger 15 minutes à 15000 RPM, 4°C (Heraeus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1379, Hanau, Allemagne).
 - 6- Eliminer le surnageant et sécher le culot à l'air libre.
- Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide 4%, la lecture étant automatique par l'appareil ABI.PRISM.
- 7- Vérifier l'identité des séquences obtenues par un programme informatique disponible sur internet tel que Blast NCBI.

H.) Production des trappeurs et des cibles

Les trappeurs et les cibles, nécessaires à l'élaboration de la biochips, seront tous deux synthétiser par amplification en PCR.

H.1.) Production des trappeurs

Les "trappeurs" qui seront fixés sur la surface de verre constituant la Biochips doivent être synthétisés. Dans ce dessein, des amorces encadrant une séquence de plus ou moins 300 paires de bases (pb) à l'intérieur de chaque insert ont été choisies. Elles font chacune 20 pb et une des amorces possède à son extrémité 5' une fonction amine espacée de six carbones du nucléotide. Cette fonction amine permettra ultérieurement la liaison covalente du trappeur sur une surface de verre-aldéhyde (paragraphe J de ce chapitre).

Ces amorces ont été produites par Eurogentec (Seraing, Belgique).

H.2.) Production des cibles

Afin de tester l'hybridation, il nous faudra travailler dans un premier temps avec des cibles de concentrations connues, relativement pures que nous hybriderons sur le damier. Ces ADN-cibles tests seront produites par PCR en amplifiant chaque insert cloné avec les amorces M13 du plasmide (et donc, communes à tous les gènes) mais qui seront cette fois biotinylées à leurs extrémités 5'.

H.3.) Méthode

La méthode est identique à celle décrite au paragraphe E de ce chapitre, à l'exception du programme PCR :

	Synthèse des cibles	Synthèse des trappeurs
<i>Tailles</i>	0,9 – 1,8 Kb	0,24 – 0,354 Kb
<i>Nombre de cycles</i>	40	40
<i>Hot start</i>	94°C 10'	94°C 10'
<i>Dénaturation</i>	94°C 30''	94°C 30''
<i>Hybridation</i>	56°C 45''	FIB : 72°C CCOX : 58°C SM22 : 60°C GTP bp : 60°C OST : 60°C APO J : 65°C 30''
<i>Elongation</i>	72°C 2'	72°C 2'
<i>Terminaison</i>	72°C 10'	72°C 10'

I.) Purification des produits PCR

I.1.) Principe

Le "kit" de purification : « High Pure PCR Product Purification » Boehringer Mannheim, Allemagne. Le principe de cette purification est basé sur la rétention de l'ADN sur une colonne de silice en présence d'agents chaotropiques tandis que sels, DMSO et dNTPs sont éliminés.

I.2.) Matériel

<i>Tampon de liaison (Boehringer, Mannheim, Allemagne)</i>	Thiocyanate de guanidium 3M Tris-HCl 10 mM Ethanol 5% pH 6,6
<i>Centrifugeuse</i>	Centrifugeuse Biofuge Pico, Heraeus Sepatech, Hanau, Allemagne.
<i>Tampon de lavage (Boehringer, Mannheim, Allemagne)</i>	NaCl 20 mM Tris HCl 2 mM pH 7,5 Ajouter 40 ml d'éthanol avant usage.
<i>Tampon d'élution (ou eau)</i>	Tris-HCL 10 mM EDTA 1 mM pH 8,5.
<i>Ethanol</i>	Merck, Darmstadt, Allemagne

I.3.) Protocole

- 1- Ajouter 500 µl de tampon de liaison par 100 µl de solution PCR.
- 2- Emboîter la colonne de silice dans un tube collecteur et déposer le mélange de l'étape 1 sur cette dernière (fixation d'ADN).
- 3- Centrifuger 30 secondes à 13000 RPM.

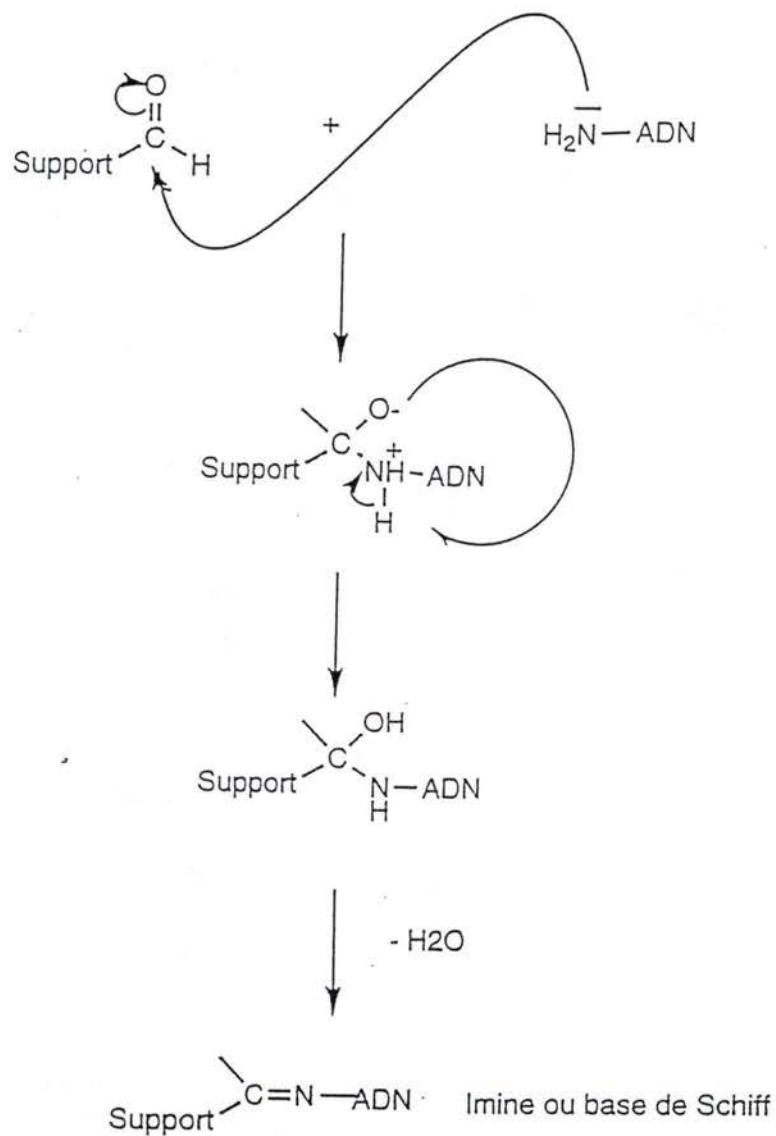


Figure II.6.) Réaction d'attaque nucléophile de l'amine sur l'aldéhyde, aboutissant à une imine ou base de Schiff.

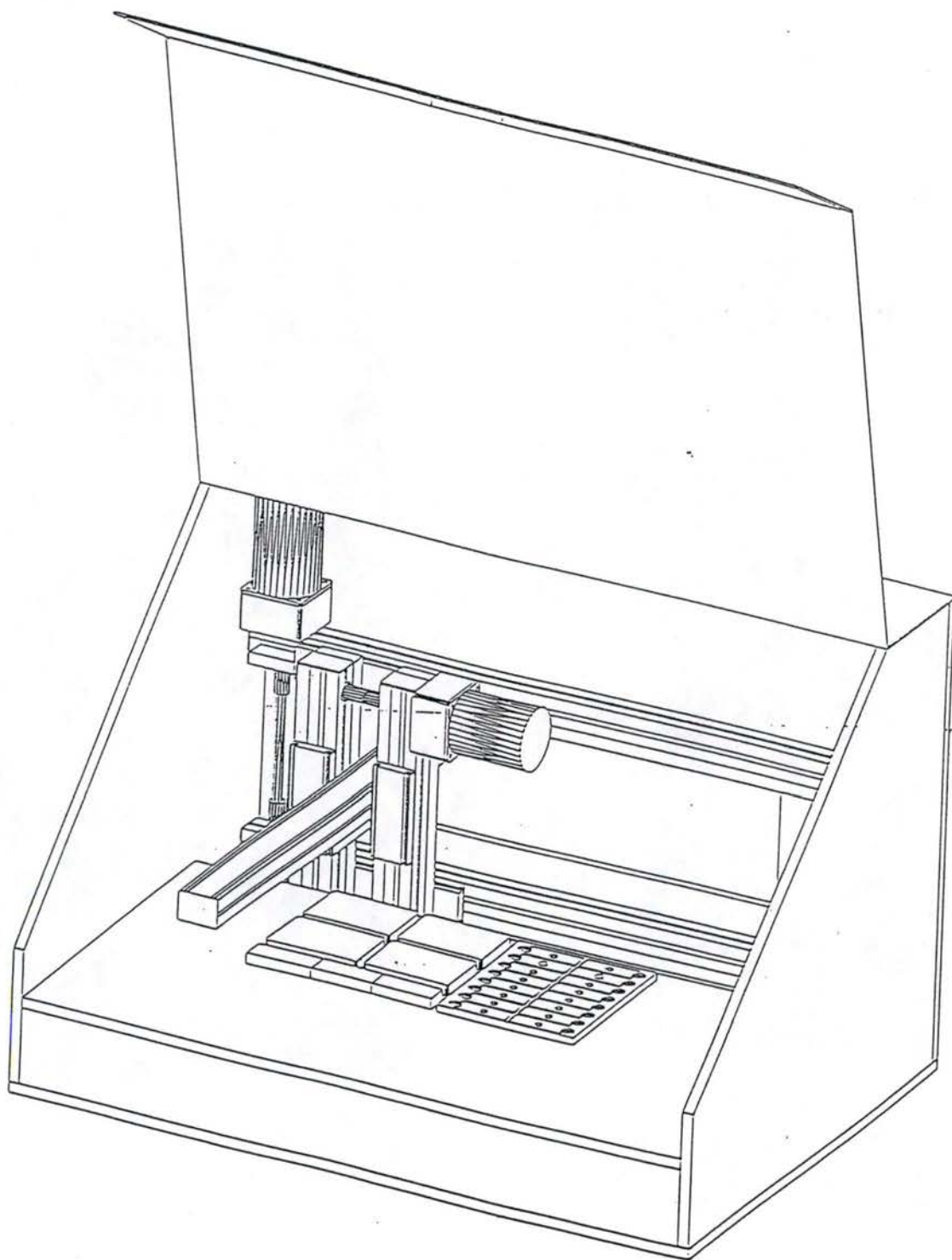


Figure II.7.) Schéma représentant le robot utilisé pour la fixation d'ADN sur les lames de verre.

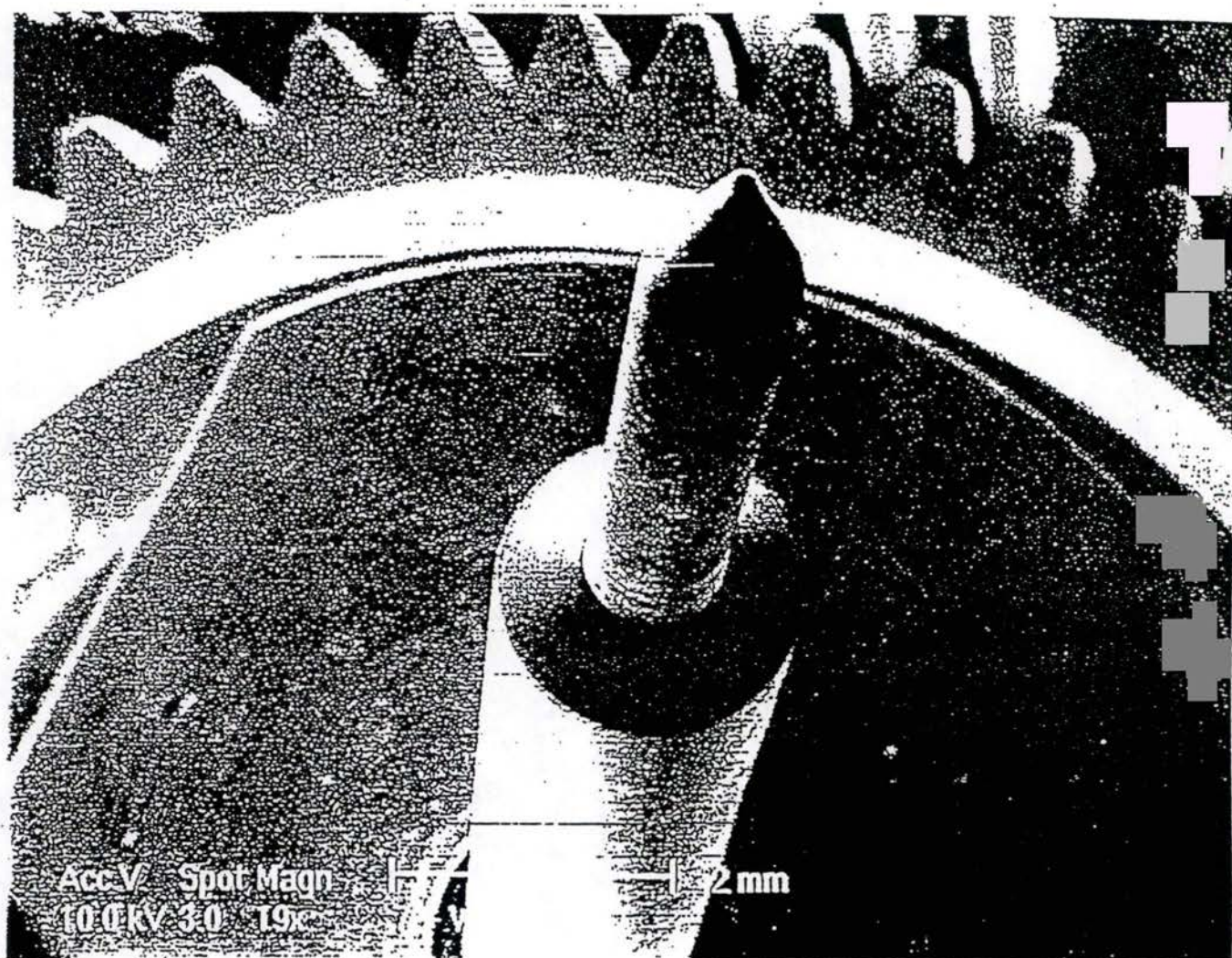


Figure II.8.) Image en microscopie à balayage de la pointe d'une aiguille utilisée avec le robot pour la fixation d'ADN sur les lames de verre. La pointe a un diamètre de 250 μm .

- 4- Eliminer le filtrat.
- 5- Laver la colonne avec 500 μ l de tampon de lavage. Centrifuger à 13000 RPM, 30 secondes et éliminer le filtrat.
- 6- Répéter l'étape 5 avec 200 μ l de tampon de lavage.
- 7- Prendre un tube collecteur propre.
- 8-Eluer l'ADN avec 200 μ l de Tampon d'élution ou avec de l'eau distillée. Une resuspension dans de l'eau a été préférée ici car le tampon d'élution contient des fonctions amines qui interféreraient avec la réaction de fixation de l'ADN sur le verre aldéhyde (voir plus loin).

J.) Fixation des trappeurs sur lames de verre

J.1.) Principe

La première étape dans l'élaboration de notre damier est la fixation des trappeurs d'ADN sur une lame de verre. L'immobilisation idéale est un lien covalent entre une des extrémité de l'ADN et le verre. Cela peut-être aisément obtenu par fixation d'un ADN aminé à son extrémité 5' sur du verre portant des fonctions aldéhydes (Cell associates, Houston, USA). La réaction est une attaque nucléophile de l'amine sur l'aldéhyde donnant lieu à la formation d'une imine (figure II-6).

La fixation d'ADN doit être site spécifique, pour qu'à un endroit donné ne se trouve qu'une seule sorte de "trappeur". Il est donc nécessaire d'utiliser un robot sachant se déplacer dans les trois directions de l'espace avec précision. Ce robot a été fabriqué par Fabelec (Néthen, Belgique) et adapté à des fins de « spotting ».

La tête de ce robot est perforée de petits trous dans lesquels des aiguilles peuvent être glissées et qui serviront au « spotting ». Cette tête se déplace dans trois directions (figure II-7). Elle viendra puiser dans la solution d'ADN et ira en déposer une petite quantité à l'endroit désiré sur la lame. Les aiguilles utilisées ont un diamètre de 250 μ m (figure II-8) (Genetix, Angleterre) et délivrent environ 1 nanolitre de liquide.

Après le dépôt d'ADN, les lames seront lavées afin d'éliminer les sels, les poussières et autres particules indésirables qui pourraient interférer avec l'étape d'hybridation. Pour cela, les lames seront plongées dans des bains successifs de détergent (SDS) ou simplement d'eau,

mais aussi dans du NaBH_4 pour réduire les aldéhydes encore réactionnelles présentes sur les lames. La dernière étape de lavage est un bain d'eau distillé à 95°C pour dénaturer les trappeurs de manière à ne garder que des ADN simple brin accrochés de façon covalente par leur extrémité 5' à la surface de la lame de verre.

J.2.) Matériel

<i>Lames</i>	CSS-25 Silylated Slides (Cel Associates, Houston, USA)
<i>Aiguilles</i>	250 μM , Genetix, Angleterre.
<i>Tampon de fixation</i>	Préparé à partir de : MES hydrate 99% (Acros, Geel, Belgique). Concentration finale 0,5 M, pH 6,5.
<i>Plaque multipuits</i>	Plaque 384 puits (Nunc, Roskilde, Danemark).
<i>Acétone</i>	Merck, Darmstadt, Allemagne.
<i>SDS 10 %</i>	Sodium Dodecyl Sulfate (Merck, Darmstadt, Allemagne)
<i>NaBH_4</i>	Aldrich, USA
<i>PBS (Phosphate Buffer Saline)</i>	Tampon phosphate 10 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne) NaCl 0,9 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) pH 7,4
<i>Ethanol absolu</i>	Merck, Darmstadt, Allemagne
<i>Trappeurs aminés</i>	Synthétisés par PCR à partir d'amorces aminées commandées chez Eurogentec (Seraing, Belgique).

J.3.) Méthode

1- Mélanger la solution d'ADN trappeur dans le MES 0,5 M pH 6,5 et ajouter de l'eau pour que le MES soit à la concentration de 0,1 M et l'ADN à 200 nM.

2- Déposer les solutions de trappeurs dans une plaque multipuits adéquate.

- 3- Programmer le robot afin qu'il aille dans les puits contenant les ADN et ensuite déposer ces derniers à l'endroit voulu sur la lame.
- 4- Entre chaque espèce de trappeur, deux lavages consécutifs de l'aiguille sont effectués. Pour cela, il plonge ces dernières une fois dans de l'eau distillée pendant 5 secondes, ensuite, 5 secondes dans un bain d'acétone, et, enfin, les aiguilles sont séchées 10 secondes à l'air libre.
- 5- Après le dépôt, laisser sécher les lames 1 heure à température ambiante.
- 6- Laver les lames dans du SDS 0,1% (15 ml) pendant 2 minutes à température ambiante (RT).
- 7- Laver les lames deux fois dans de l'eau distillée (15 ml) pendant 2 minutes, RT.
- 8- Laver les lames dans une solution 75 % PBS/ 25% éthanol/ 2,5 mg/ml NaBH₄ (15 ml), RT.
- 9- Plonger les lames dans un Falcon contenant 35 ml d'eau distillée préchauffée dans un bain à 100 °C pendant 3 minutes.
- 10- Laisser sécher les lames à l'air libre.

K.) Hybridation d'ADN cible sur les microdamiers

K.1.) Principe

La deuxième étape de l'utilisation du damier à ADN est l'hybridation des ADN cibles sur les trappeurs précédemment fixés sur le verre.

Les ADN cibles possèdent à leur extrémité 5' une biotine qui servira pour leur détection ultérieure.

L'hybridation de deux ADN comporte deux points : premièrement la dénaturation préalable et l'élimination des structures secondaires des ADN en présence (cible-cible et trappeur-trappeur), deuxièmement, l'hybridation proprement dite où les ADN complémentaires forment des hybrides entre eux (cible-trappeur). Lorsque la solution d'hybridation, contenant l'ADN-cible, a été déposée sur la lame portant les trappeurs, elle est couverte d'une lame couvre-objet, cette dernière étant ensuite scellée. La solution d'hybridation se compose des ADN cibles, d'un tampon spécifique de la réaction et d'ADN de sperme de saumon soniqué servant à saturer les sites non spécifiques de fixation de l'ADN.

K.2.) Matériel

<i>Lames couvre-objet</i>	15x15 mm Microscope Glass Cover Slips, Chance Proper, Warley, England.
<i>Sperme de saumon 10 mg/ml</i>	Sigma, St Louis, USA.
<i>Tampon SSC</i>	NaCl 3 M (Merck, Darmstadt, Allemagne) citrate Na 0,33 M (Merck, Darmstadt, Allemagne) pH 7,0
<i>Tampon d'hybridation</i>	-2 x SSC final -5 x Denhardt final Lambdatech, Namur, Belgique.
<i>Tampon B1</i>	Préparation pour 1 litre : -11,6 g acide maléique (Merck, Darmstadt, Allemagne) -8,77 g NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne) -pH 7,5 (avec des pastilles d'NaOH)
<i>Tampon de lavage</i>	-Tween 20 : 0,1 % (Sigma, St Louis, U.S.A.) -Tampon B1 : 10 % -Eau distillée
<i>DPX</i>	DPX mountand, DBH chemicals (Poole, Angleterre)

K.3.) Protocole

1- Préparer la solution d'hybridation avec la quantité d'ADN désirée, mélanger avec du tampon d'hybridation et de l'ADN de sperme de saumon soniqué en concentration adéquate. Le volume final mélange d'hybridation est de 5 µl. Le tampon devra être composé de SSC 2x, de Denhart 5x et d'ADN de sperme de saumon à une concentration de 100 µg/ml.

2- Déposer 5 µl de la solution sur le damier et couvrir d'un couvre-objet de 15x15 mm. Sceller au DPX.

3- Placer la lame à 95°C pendant 5 minutes sur un bloc chauffant.

- 4- Placer la lame dans un four à la température d'hybridation adéquate pendant 2 heures, la lame étant placée dans une enceinte saturée en humidité.
- 5- Enlever la lame du four, gratter délicatement le DPX.
- 6- Laver 4 x 2 minutes les lames dans du tampon de lavage, les lames couvre-objet se décolleront aisément.
- 7- Sécher les lames, placer à 4°C ou utiliser tout de suite.

L.) Détection des microdamiers par précipitation de sels d'argent

L.1.) Principe

Cette méthode utilise la réduction des ions Ag^{++} en argent atomique catalysée par l'or. En fin de réaction, précipité métallique autour de l'or est obtenu (Lackie, 1996).

Que cette technique soit « froide » représente déjà un avantage, de plus, elle ne nécessite aucun appareillage particulier, sinon deux solutions de révélation, à savoir, les sels d'argent et une solution contenant un réducteur. Le coût de cette méthode, comparé avec celui d'autres techniques, est très bas, ce qui en fait une méthode de choix pour un usage courant. Le grand désavantage de cette méthode est une sensibilité élevée aux perturbations extérieures : la moindre poussière, la moindre évaporation locale durant l'hybridation provoquera un précipité d'argent, créant lors de la révélation un background gênant ou des taches locales pouvant nuire à l'analyse des spots.

L'or colloïdal, une particule de 10 nm, est couplé à une streptavidine qui ira se lier à la biotine se trouvant sur les cibles hybridées aux trappeurs. Il y aura donc précipitation d'argent principalement aux endroits où l'or est présent, c'est-à-dire où il y a eu hybridation positive.

L.2.) Matériel

<i>Solution de révélation A</i>	Silver Enhancer solution A, Sigma, St Louis, USA.
<i>Solution de révélation B</i>	Silver Enhancer solution B, Sigma, St Louis, USA.
<i>Conjugué or-streptavidine</i>	Streptavidin 10 nm colloïdal gold labelled,

	$A_{520} = 5.0$ (Sigma, St Louis, USA)
<i>Tampon B1</i>	Préparation pour 1 litre : -11,6 g acide maléique -8,77 g NaCl (Merck, Darmstadt, Allemagne) -pH 7,5 (avec des pastilles d'NaOH)
<i>Tampon de saturation</i>	-Tampon B1 -0,1 % lait en poudre Gloria (Nestlé, Vevey, Suisse)

L.3.) Protocole

Préparatif : les solutions d'argent étant conservées à 4°C, les mettre à température ambiante avant utilisation.

- 1- Diluer 1000 x le conjugué STAV-Or dans du tampon de saturation.
- 2- Déposer 800 µl de ce mélange sur un parafilm horizontal.
- 3- Retourner délicatement la lame issue de l'hybridation sur la solution qui se répartira sur toute la surface inférieure de la lame.
- 4- Laisser incubé 45 minutes à température ambiante.
- 5- Laver la lame 5 x 2 minutes dans du tampon de lavage.
- 6- Préparer immédiatement avant usage un mélange 50 % / 50 % des deux solutions d'argent.
- 7- Déposer 800 µl de ce mélange sur un parafilm horizontal et y retourner délicatement la lame.
- 8- Laisser incubé 10 minutes.
- 9- Répéter les étapes 6 et 7, laisser incubé 10 minutes.
- 10- Répéter les étapes 6 et 7, laisser incubé 5 minutes.
- 11- Plonger le lame dans de l'eau distillée 5 minutes afin de stopper la réaction.
- 12- Laisser sécher la lame.

M.) Quantification

Les spots seront lus par un scanner à diapositives (Nikonscan II, Nikon, Tokyo, Japon) puis quantifiés par un programme informatique, le « NIH Image », qui peut mesurer l'intensité moyenne des pixels d'une zone déterminée par l'utilisateur, donnant de ce fait une mesure représentative de la quantité d'hybrides à cet endroit particulier. Une mesure du background peut être faite, puis, en faisant le rapport de l'intensité de chaque spot sur l'intensité du background, on obtient une mesure que nous appelons RATIO, qui peut être comparée de damier à damier.

N.) Culture des fibroblastes WI-38

N.1.) Les cellules

Les cellules utilisées sont des fibroblastes humains de poumon fœtal, souche WI-38, prélevés en 1961 par Hayflick et Moorehead et conservés depuis à "l'American Type Collection".

Ces cellules sont mises en culture dans des boîtes de 75 cm² (Nunc, Denmark) dans du milieu BME (Basal Medium Eagle, Flow Laboratories, U.K.) auquel est ajouté 10% de sérum de veau fœtal. Ce sérum contient de nombreux facteurs de croissance nécessaires à la survie et à la division cellulaire.

N.2.) Condition stérile

Les cultures cellulaires nécessitent la plus grande stérilité possible. L'ensemble du matériel utilisé est stérilisé par un passage de 6 heures dans un stérilisateur à 180°C. Les milieux sont stérilisés par filtration sur filtre de 0,2 µm (Sartorius, Allemagne).

N.3.) Trypsinisation

Pour récupérer les cellules, il est nécessaire de les trypsiniser. Cette étape permet de les détacher du fond de leur boîte de culture. La trypsine utilisée est une solution stérile

composée de trypsine 0,25 % diluée dans une solution A de Gibco (Grande-Bretagne) : 0,4 g/l de KCl ; 2,2 g/l de NaHCO_3 (Merck, Allemagne) ; 6,8 g/l de NaCl (Merck, Allemagne) ; 1 g/l de glucose (Merck, Allemagne) et 0,005 g/l de rouge de phénol.

En pratique, les boîtes de cultures sont rincées avec du milieu sans sérum après avoir été totalement décantées. Ces lavages éliminent toutes traces de sérum pouvant inhiber l'action de la trypsine. Par boîte de 75 cm² on met 2 ml de solution de trypsine pendant environ 1 minute. On décante ensuite sans enlever totalement le fond de solution restant. On réincube pendant 10 minutes à 37°C.

Lorsque les cellules sont détachées, 10 ml de BME + 10 % de sérum sont ajoutés par boîte de culture de 75 cm².

Les cellules sont ensuite agitées fortement avec une pipette Pasteur en projetant le milieu BME contre la paroi de la boîte pour rompre les amas de cellules.

Ensuite 20 ou 50 ml de BME +10 % de sérum seront ajoutés suivant que l'on réalise un repiquage en 2 ou en 4 boîtes. Le milieu contenu dans la boîte trypsinisée est finalement réparti également entre les nouvelles boîtes.

N.4.) Conservation des cellules

Nous disposons d'un stock de cellules congelées à -196°C dans de l'azote liquide.

Congélation

- Détacher les cellules par trypsinisation de la boîte de culture.
- Centrifuger 10 minutes à 1000 RPM (centrifugeuse Hettich Universal, Allemagne) les cellules reprises dans 10 ml de BME + 10 % de sérum.
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 0,4 ml de BME additionné de 10 % de diméthyl sulfoxyde (DMSO, Merck, Allemagne) comme agent cryoprotecteur.
- Déposer les cellules dans un cryotube (Nunc, Denmark).

La congélation des cellules est réalisée grâce à un appareil (PTLD 75, L'Air Liquide, Belgique) qui réalise un abaissement en deux phases de la température. Celle-ci est d'abord abaissée jusqu'à -40°C à raison de 1°C par minute puis très rapidement jusqu'à -100°C. Le cryotube est ensuite stocké à -196°C.

Décongélation

- Plonger le cryotube dès sa sortie de l'azote liquide dans un bain à 40°C.
- Centrifuger 10 minutes à 1000 RPM (centrifugeuse Hettich Universal) et éliminer le surnageant.
- Resuspendre délicatement les cellules dans 1 ml de BME + 10 % de sérum.
- Repiquer les cellules dans un boîte de culture qui reçoit 15 ml de BME + 10 % de sérum.

O.) Extraction de l'ARN total

O.1.) Principe

Cette technique se base sur l'extraction différentielle des ARN par des solvants organiques.

La première étape consiste en la lyse cellulaire. Le tampon de lyse contient également des inhibiteurs de RNAses.

La seconde étape est l'extraction des ARN totaux en présence de phénol et de chloroforme. Après centrifugation, on obtient trois phases : phase organique phénol-chloroforme et interphase, toutes deux contenant protéines et ADN, et phase aqueuse contenant les ARN.

Lors de la troisième étape, l'ARN total est précipité. Pour obtenir une grande pureté de l'ARN, deux précipitations sont réalisées. La première, d'une heure, à -20°C, en présence d'isopropanol et, la seconde dure une nuit, à -20°C, en présence d'éthanol et d'acétate d'ammonium.

La quatrième étape, le lavage de l'ARN, est exécuté avec de l'éthanol. L'ARN est ensuite séché et resuspendu dans de l'eau RNase-free.

O.2.) Matériel

Toutes les solutions et tout le matériel utilisé doivent être impérativement RNase-free. Le matériel (verrerie, tubes, pipettes, bouteilles, ...) supportant des températures élevées peut être rendu RNase-free par un traitement au four pendant six heures à 180°C. Le reste du matériel est lavé, pendant une nuit, dans une solution de SDS 10 %.

De préférence, les solutions sont préparées au moyen d'H₂O distillée contenant 0,5 % de diéthylpyrocarbonate (DEPC).

<i>PBS</i>	-Tampon phosphate 10 mM stérile (Merck, Darmstadt, Allemagne) -NaCl 0,9 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) pH 7,4 stérilisation par autoclavage (20', 120°C)
<i>Tubes en verre de 30 ml</i>	(Corex, USA) Rendus RNase-free par un traitement au four (180°C, 6 heures).
<i>Centrifugeuse</i>	Beckmann, centrifuge j21-b model, rotor 2314 (Analis, Namur, Belgique)
<i>Tampon de lyse (pour 500 ml)</i>	250 g de thiocyanate de guanidine 17,5 ml de citrate de sodium 0,75 M pH 7,0 26,5 ml de sarkosyl 10 % (Sigma, St Louis, U.S.A.) eau-DEPC 0,5 % pour atteindre 500 ml
<i>H₂O RNase-free (0,5 % DEPC)</i>	A un litre d'eau, ajouter 5 ml de DEPC. Agiter fortement et incubé la nuit à 37°C. Le lendemain, autoclaver pendant 20' à 120°C.
<i>DEPC</i>	(Janssens Chimica, Beerse, Belgique)
<i>Mercaptoéthanol</i>	(Janssens Chimica, Beerse, Belgique)

O.3 .) Protocole

- 1- Le jour avant l'extraction, les cellules sont repiquées à demi-densité. Retirer le milieu de culture. Rincer les cellules 2 fois avec 10 ml de PBS stérile à 4°C.
- 2- Ajouter 4 ml de tampon de lyse (additionné juste avant utilisation de 0,35 ml de mercaptoéthanol par 50 ml) par boîte de culture T75. Mélanger pour répandre le tampon de lyse sur toute la surface de la boîte et racler les cellules dans le fond des boîtes.
- 3- Transférer la solution dans un tube Corex (USA) de 30 ml à l'aide d'une pipette Pasteur.
- 4- Ajouter pour un volume de tampon de lyse :
 - 0,1 volume d'une solution d'acétate de sodium 2M, pH 4,0.
 - 1 volume de phénol saturé en citrate de sodium 0,1M (4°C)
 - 0,2 volume de chloroforme.
 Mélanger après chaque addition.
- 5- Mélanger vigoureusement la suspension finale et refroidir sur glace pendant 20 minutes.
- 6- Centrifuger à 8000 RPM pendant 20 minutes à 4°C.
- 7- Prélever délicatement la phase aqueuse (supérieure) et la déposer dans un nouveau tube Corex (USA) de 30 ml. Eliminer la phase organique.
- 8- Ajouter 1 volume d'isopropanol. Mélanger vigoureusement et laisser précipiter pendant une heure à -20°C.
- 9- Centrifuger à 10500 RPM pendant 20 minutes à 4°C. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 2 ml de tampon de lyse.
- 10- Ajouter 0,5 ml d'acétate d'ammonium à pH 7,5 et 7,5 ml d'éthanol 100 %.
- 11- Précipiter la nuit à -20°C.
- 12- Centrifuger à 12000 RPM pendant 20 minutes à 4°C.
- 13- Laver le culot d'ARN au moyen de 5 ml d'éthanol à 4°C.
- 14- Centrifuger à 12000 RPM pendant 20 minutes à 4°C.
- 15- Décantier le surnageant au maximum. Sécher le culot à l'air libre.
- 16- Resuspendre le culot dans 100 µl d'eau distillée RNase-free.
- 17- Estimer la quantité et la pureté d'ARN total par mesure des absorbances à 260 et 280 nm au spectrophotomètre.
- 18- Avant utilisation, l'ARN est conservé à -20°C.

P.) Vérification de la qualité des l'ARN sur gel d'agarose 1%

L'ARN formant beaucoup de structures secondaires, le gel d'électrophorèse doit être conçu pour dénaturer l'ARN de manière à ce que ce dernier migre selon sa taille réelle et non selon sa structure secondaire. Pour cela, le gel d'agarose simple, décrit dans le paragraphe D, doit être modifié en ajoutant du MOPS et du formaldéhyde. Tout le matériel doit être RNase-free.

P.1.) Matériel

<i>Gel d'agarose 1 % (pour 150 ml)</i>	Eau distillée RNase-free : 115,4 ml Agarose : 1,5 g (Gibco BRL, Gaithersburg, USA.) MOPS 20 X : 7,5 ml Formaldéhyde 37 % : 27 ml
<i>MOPS 20 X</i>	MOPS 0,4 M : 41,86 g Acétate de sodium : 16,67 g (Merck, Darmstadt, Allemagne) EDTA 20 mM : 20 ml (Merck, Darmstadt, Allemagne) Ajouter 370 ml d'H ₂ O-DEPC PH 7,0 Porter à 500 ml
<i>Formamide</i>	Sigma (St Louis, USA)
<i>Formaldéhyde</i>	Belgolabo (Overijse, Belgique)
<i>MOPS</i>	Sigma (St Louis, USA)
<i>DYE pour ARN</i>	0,25 % bleu de Bromophénol (Acros, Geel, Belgique) 50 % de glycérol (Merck, Darmstadt, Allemagne) 1 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne)

P.2.) Méthode

- 1- Dans un Erlenmeyer RNase-free de 280 ml, déposer 115,4 ml d'H₂O-DEPC, 27 ml de tampon MOPS 20X et 1,5 g d'agarose. Porter à ébullition.
- 2- Refroidir
- 3- Ajouter le Formaldéhyde à 37%
- 4- Couler le gel et laisser polymériser pendant une heure
- 5- Immerger le gel dans du tampon MOPS 1X (tampon d'électrophorèse) et réaliser un pré-run de 5 minutes à 60 Volts.
- 6- Préparer les échantillons :
 - 3 µg d'ARN dans un volume de 4µl d'eau stérile
 - Formamide : 7,5 µl
 - MOPS 20 X : 0,75 µl
 - Formaldéhyde : 2,7 µl
 - Mélanger et dénaturer 15 minutes à 65°C.
 - Déposer immédiatement sur glace pendant 2 minutes.
 - Centrifuger brièvement.
 - Ajouter 2 µl de Bromure d'éthidium.
 - Ajouter 0,5 µl de colorant pour RNA.
- 7- Déposer les échantillons dans les puits.
- 8- Migration 60 V pendant 2 heures.

Q.) Purification des ARN messagersQ.1.) Principe

Les ARN messagers ne représentent seulement que 1 à 5 % de l'ARN cellulaire total. Cette quantité varie en fonction du type cellulaire et de l'état physiologique de la cellule. Le pourcentage restant est représenté par les ARN ribosomiaux et de transferts. On pense en général qu'il y a 500000 ARNm par cellule de mammifère, dont de 10000 à 30000 différents. Certains messagers représentent 0,5 % du pool total d'ARNm, d'autres en-dessous de 0,01 %, ces derniers sont appelés « rares », soit moins de 10 copies par cellule.

Nous avons utilisé le kit Oligotex-dT de Qiagen pour purifier les ARNm à partir des ARN totaux. Cette technique se base sur la présence à l'extrémité 3' des ARNm d'un homopolymère de 20 à 250 adénosines (queue de poly-A). Il est dès lors aisé de séparer les ARNm en utilisant un support solide sur lequel sont greffés des poly-dT. Le support solide utilisé dans ce kit consiste en des particules de latex Oligotex. Les ARN messagers vont s'hybrider sur les poly-T couplés sur les particules de latex. Plusieurs lavages de ces dernières vont permettre l'élimination des ARN structuraux. Ensuite, les ARNm seront déshybridés du poly-T en diminuant la force ionique.

Q.2.) Matériel

<i>Suspension Oligotex</i>	10 % de particules Oligotex dans : -10 mM Tris-HCl (pH 7,5) -500 mM NaCl -1 M -EDTA -0,1 % SDS -0,1 % NaN ₃ (Qiagen, Chatsworth, USA)
<i>Tampon de liaison 2x</i>	-20 mM Tris-HCl (pH 7,5) -1000 mM NaCl -2 mM EDTA -0,2 % SDS (Qiagen, Chatsworth, USA)
<i>Tampon d'élution</i>	-5 mM Tris-HCl (pH 7,5) (Qiagen, Chatsworth, USA)
<i>Tampon de lavage</i>	-10 mM Tris-HCl (pH 7,5) -150 mM NaCl -1 mM EDTA (Qiagen, Chatsworth, USA)
<i>Centrifugeuse</i>	Centrifugeuse Biofuge Pico, Heraeus Sepatech, Hanau, Allemagne.

Q.3.) Protocole

Préparatifs :

- Chauffer la suspension Oligotex à 37°C et le tampon d'élution à 70°C.
- Bien mélanger la suspension juste avant l'usage.
- Mélanger l'ARN total avec de l'eau, du tampon de liaison 2X et de la suspension Oligotex dans un Eppendorf en accord avec le tableau ci-dessous.

<i>ARN total</i>	<i>ARN + eau</i>	<i>2 X Tampon de liaison</i>	<i>Suspension Oligotex</i>	<i>Volume total</i>
0-250 µg	250 µl	250 µl	15 µl	515 µl

- 2- Mélanger et incubé 3 minutes à 65°C.
- 3- Incuber 10 minutes à température ambiante (RT).
- 4- Centrifuger 2 minutes à 13000 RPM. Eliminer le surnageant.
- 5- Resuspendre dans 400 µl de tampon de lavage, vortexer. Déposer sur une colonne du kit et centrifuger 30 secondes à 13000 RPM. Eliminer le filtrat.
- 6- Laver la colonne avec 400 µl de tampon de lavage. Eliminer le filtrat.
- 7- Eluer deux fois avec 20-100 µl de tampon d'élution préchauffé à 70 °C, pipetter quelques fois pour bien resuspendre la résine, centrifuger 30 secondes à 13000 RPM. Une deuxième élution sera réalisée avec le premier éluat.

R.) Rétro-transcription des ARNm et marquage des ADNcR.1.) Principe

La RT consiste en la synthèse d'un ADN complémentaire d'un ARNm servant de matrice. Celle-ci se fait de la queue de poly-A vers l'amont de la séquence en utilisant des amorces oligonucléotidiques constituées d'un poly-T plus quelques bases dont une variable, grâce à l'utilisation d'une rétro-transcriptase. Après dégradation de l'ARN ayant servi de matrice, l'ADN synthétisé est simple-brin. Les ADNc synthétisés reflètent directement la

proportion originelle des ARNm de départ. Les amorces utilisées étant biotinylées à l'extrémité 5', l'ADNc synthétisé servira donc directement de cible sur le damier.

R.2.) Matériel

<i>Amorces oligonucléotidiques (27-mer) (Eurogentec, Seraing , Belgique.)</i>			
<i>Nom</i>	<i>Séquence</i>	<i>Tm</i>	<i># bases</i>
<i>TVT-Biot</i>	5'-CGGCTGCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTVT-3'	66°C	27
<i>TVA-Biot</i>	5'-CGGCTGCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTVA-3'	66°C	27
<i>TVC-Biot</i>	5'-CGGCTGCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTVC-3'	68°C	27
<i>TVG-Biot</i>	5'-CGGCTGCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTVG-3'	68°C	27
<i>Tampon 5 X</i>	1 st strand buffer (Gibco, Gaithersburg, USA)		
<i>DTT 10 X</i>	DTT 0,1 M (Gibco, Gaithersburg, USA)		
<i>RNase inhibitor</i>	Promega (Madison, USA)		
<i>DNTp Mix</i>	5 mM chaque, Eurogentec (Seraing, Belgique)		
<i>Rétrotranscriptase</i>	Superscript II, 200 U/μl (Gibco, Gaithersburg, USA)		
<i>Acétate de sodium</i>	Merck (Darmstadt, Allemagne)		
<i>Ethanol</i>	Merck (Darmstadt, Allemagne)		
<i>Tampon Tris</i>	Fait à partir de : TRIS, Merck (Darmstadt, Allemagne)		
<i>Tampon TE</i>	Stock 10 x : -10 mM TRIS (Merck, Darmstadt, Allemagne) -1 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Allemagne) pH 8		
<i>Centrifugeuse</i>	Centrifugeuse Biofuge Pico, Heraeus Sepatech, Hanau, Allemagne.		

R.3.) Protocole (pour un tube)

- 1- Mélanger la quantité d'ARNm (1µg) voulue et les oligo-dT de manière à ce que ces derniers soient à une concentration de 73 pmol/µl.
- 2- Ajouter de l'eau RNase-free pour arriver à un volume final de 27,5 µl.
- 3- Dénaturer pendant 3 minutes à 65°C.
- 4- Procéder à une étape « d'annealing » des oligo-dT à l'ARN pendant 10 minutes à 25°C.
- 5- Ajouter ensuite :
 - 10 µl de tampon 5 X
 - 5 µl de DTT 0,1 M
 - 1 µl d'inhibiteur de RNase. (40 U/µl)
 - 5 µl dNTP Mix
- 6- Ajouter 1,5 µl d'enzyme (200 U/µl)
- 7- Incuber à 37°C pendant 2 heures.
- 8- Ajouter 4,1 µl d'acétate de sodium 3M à 25°C, mélanger et ajouter 108 µl d'éthanol 100 %, 25°C.
- 9- Centrifuger 15 minutes à 13000 RPM, 25 °C.
- 10- Enlever le surnageant et le garder en réserve.
- 11- Laver le dépôt avec 500 µl d'éthanol 80 % à 25°C, mélanger délicatement, prélever le surnageant et le conserver.
- 12- Sécher sous vide pendant 3 minutes et resuspendre dans 10 µl TE en grattant bien la surface interne du tube où se trouve le dépôt.
- 13- Incuber 3 minutes à 100°C et mettre de suite sur glace.
- 14- Ajouter 2,5 µl de NaOH 1N, incuber 10 minutes à 37°C.
- 15- Neutraliser en ajoutant 2,5 µl de Tris-HCl 1 M pH 6,8 et 2 µl d'HCl 1M RT.
- 16- Ajouter 1,4 µl d'acétate de sodium 3M RT et 37 µl d'éthanol 100 % RT.
- 17- Centrifuger 15 minutes à 13000 RPM, RT.
- 18- Enlever le surnageant et le garder en réserve.
- 19- Laver avec 500 µl d'éthanol 80 % à température ambiante, centrifuger 1 minute.
- 20- Enlever le surnageant.
- 21- Sècher sous vide 2-3 minutes, resuspendre dans de l'eau distillée pour arriver à la concentration désirée (9 µl).
- 22- Chauffer à 65°C pendant 30 secondes.

- 23- Centrifuger 2 minutes à vitesse maximale pour éliminer les débris restants.
- 24- Mettre dans un nouveau tube et conserver à -20°C .

Chapitre III : Résultats et Discussions

A.) Stratégie du mémoire

Le but de ce mémoire était l'élaboration d'un micro-damier permettant l'analyse de la variation de l'expression de gènes liés au vieillissement cellulaire. Dans un premier temps, nous devions réaliser et optimiser ce micro-damier comprenant les séquences d'intérêts. Une fois ce biochips optimal, nous sommes passés à l'analyse de l'expression de ces gènes dans des cellules jeunes ou vieilles.

Neuf gènes différentiellement exprimés au cours du vieillissement ont été sélectionnés : l'ARN messenger des gènes codant pour la sous-unité III de la cytochrome c oxydase (CCOX), la GTP- α binding protein (GTP), Smooth Muscle Protein 22 (SM22), la fibronectine (FIB), l'ostéonectine (OST), l'apolipoprotéine J (APO-J), SS9 et l' α 1(I)-procollagène (PRO) sont surexprimés au cours du vieillissement *in vitro* des fibroblastes humains (Dumont *et al.*, soumis).

Quand au neuvième, la sous-unité β de la phénylalanine tRNA synthétase (FRS-2), son ARNm est réprimé chez les cellules âgées (Gonos *et al.*, 1998).

Outre ces neuf gènes, le biochips contiendra un standard interne servant à normaliser l'expression cellulaire. L'expression de ce gène choisi comme référence doit être stable. Le gène sélectionné est celui codant pour la glycéraldéhyde-phosphate deshydrogénase (GAPDH).

Une séquence trappeur appartenant au cytomégalo virus humain (HCMV) servira de contrôle négatif d'hybridation.

La première étape de la réalisation du damier consiste en la synthèse des séquences appelées ADN-trappeurs qui seront fixées sur ce dernier. Les trappeurs seront synthétisés par PCR pour être ensuite fixés de façon covalente sur une lame de verre.

Le choix de la taille des trappeurs influence fortement le rendement de l'hybridation sur support solide. Il a été montré qu'une taille d'environ 300 pb donne un rendement d'hybridation maximal (Zammatteo *et al.*, 1997). Une taille moyenne de trappeur de 300 pb a donc été sélectionnée pour l'élaboration du microdamier.

A partir du moment où les trappeurs sont fixés sur le verre, la seconde étape est de vérifier que leur cible complémentaire parvient à s'hybrider de manière spécifique. Pour cela, des ADN-cibles complémentaires aux ADN-trappeurs ont été produits par PCR en utilisant des amorces biotinylées. Ces ADN-cibles seront hybridés sur les damiers réalisés

précédemment. Afin d'optimiser le biochips, plusieurs paramètres seront testés tels que la température, la spécificité et la sensibilité.

Dans un dernier temps, le biochips sera utilisé pour analyser l'expression des gènes choisis au cours du vieillissement *in vitro* des fibroblastes humains. Des ARNm extraits de fibroblastes WI-38 jeunes et vieux seront rétrotranscrits en ADNc. Ces deux populations d'ADNc-cibles seront hybridées sur deux damiers séparés.

La rétrotranscription sera initiée par une amorce poly-dT complémentaire du site de polyadénylation des ARNm. Afin de s'assurer que les ADNc synthétisés puissent être mis en évidence, les séquences trappeurs ont été sélectionnées à proximité du site poly-A de l'ARNm du gène correspondant.

L'analyse des résultats nous permettra de comparer le taux d'expression de ces gènes entre les cellules jeunes et vieilles.

B.) Caractérisation et séquençage des plasmides contenant les gènes d'intérêt

La première étape de ce mémoire a été d'analyser les plasmides contenant les gènes d'intérêt afin de vérifier leur composition. Ces plasmides nous ont été donnés par E. Gonos *et al* (National Hellenic Research Foundation, Institute of Biological Research and Biotechnology, 48 Vas. Constantinou Ave., Athens 11635, Greece). Nous disposons de neuf plasmides différents contenant des fragments d'ADNc de rat dont les noms et les tailles sont repris dans le tableau suivant.

<i>Nom des gènes</i>	<i>Tailles des inserts</i>
Cytochrome c oxydase (III) (CCOX)	1Kb
SS9	0,7 Kb
GTP- α binding protein (GTP)	1 Kb
Ostéonectine (ost)	1,1 Kb
Fibronectine (fib)	1,6 Kb
Smooth Muscle protein 22 (SM22)	0,7 Kb
Phénylalanine tRNA synthase (FRS-2)	1,6 Kb

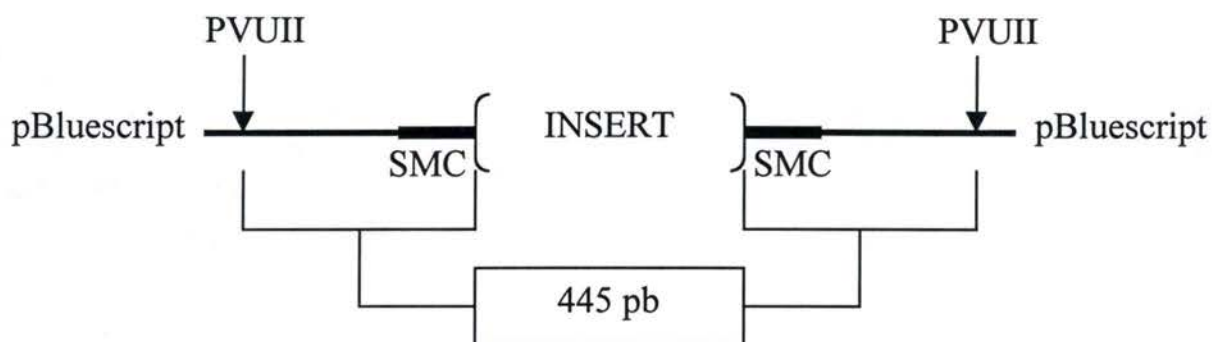


Figure III.1.) Représentation schématique des environs du site multiple de clonage (SMC) du plasmide Bluescript SK, flanqué par des site de restriction PVUII. Une restriction par cet enzyme provoque la libération du SMC, soit 445 pb, et de son insert.

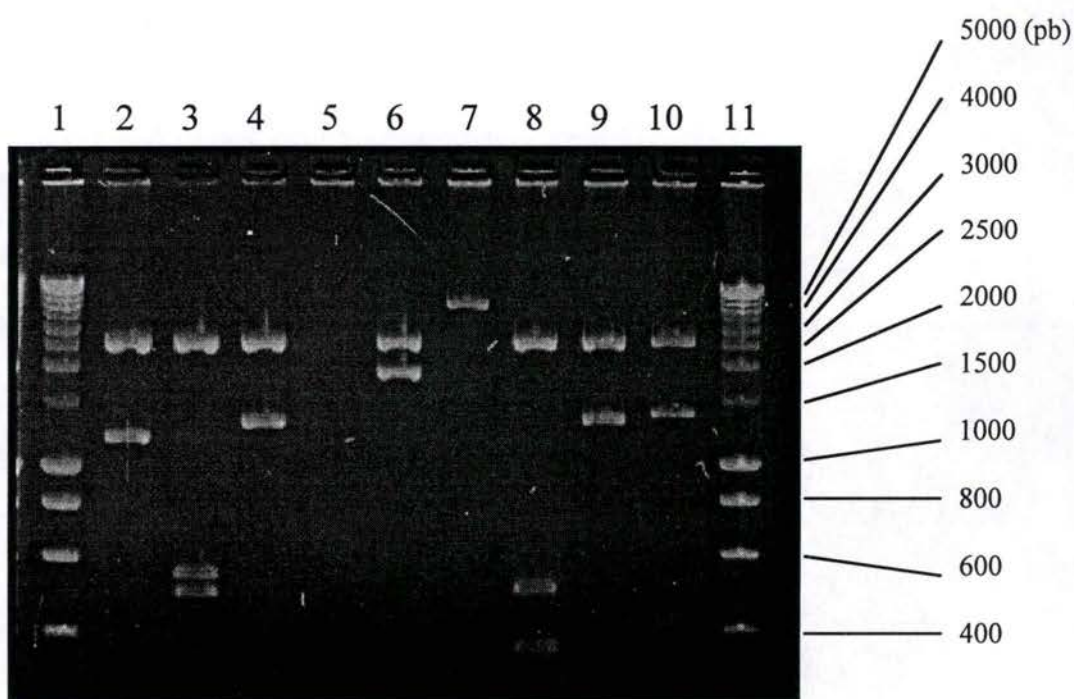


Figure III. 2. Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % de la restriction par PVUII des plasmides contenant les gènes d'intérêts. 10 µl des produits de restriction sont déposés par puits.

- Piste 1 : marqueur de poids moléculaire Smart Ladder
- Piste 2 : cytochrome c oxydase
- Piste 3 : SS9
- Piste 4 : ostéonectine
- Piste 5 : APO J
- Piste 6 : fibronectine
- Piste 7 : procollagène
- Piste 8 : SM22
- Piste 9 : GTP
- Piste 10 : FRS-2
- Piste 11 : marqueur de poids moléculaire Smart Ladder

Apolipoprotéine J (APO J)	1,5 Kb
α 1(I)-procollagène (PRO)	1,1 Kb

Ces fragments de gènes sont clonés dans le plasmide Bluescript SK d'une taille de 2,96 Kb. Des bactéries *E. Coli Sure* compétentes ont été transformées par ces plasmides.

Afin de créer les trappeurs qui seront fixés sur la biochips, la séquence des différents ADNc dont nous disposons doit être connue. Dans un premier temps, les souches de *E. Coli Sure* contenant les plasmides ont été mises en culture et des préparations d'ADN plasmidiques ont été réalisées. Les plasmides seront extraits des cultures par minipréparation ou par maxipréparation suivant nos besoins. Dans un premier temps, les plasmides seront analysés par des restrictions.

B.1.) Restrictions

Les plasmides isolés ont été tout d'abord caractérisés par restriction. Une première restriction des plasmides a été faite avec l'enzyme PVUII comme expliqué dans le chapitre II. Cet enzyme permet le relargage de l'insert en coupant de part et d'autre du site multiple de clonage du plasmide (figure III.1.). Pour chaque restriction il doit donc y avoir au minimum deux bandes. La plus grande, de 2515 pb, correspond au plasmide libéré de son insert. La deuxième bande doit correspondre à la taille de l'insert incrémenté des 455 pb correspondant au site multiple de clonage du plasmide. De plus, pour certains gènes plus de deux bandes seront observées. Cela signifie que l'insert lui-même possède en sa séquence un ou plusieurs sites de restriction pour l'enzyme PVUII.

Au vu des résultats, il est possible de tirer plusieurs conclusions. Tout d'abord, les plasmides contenant les fragments CCOX, SS9, ostéonectine, fibronectine, SM22, GTP et APO-J possèdent un profil de restriction correspondant aux tailles attendues (figure III.2.). Dans le tableau ci-dessous sont reprises les tailles attendues des bandes sur le gel d'électrophorèse pour chacun des plasmides.

<i>Plasmides</i>	<i>Tailles attendues pour la bande correspondant à l'insert.</i>	<i>Tailles attendues pour la bande correspondant au plasmide sans son SMC.</i>
<i>CCOX</i>	1,4 Kb	2,5 Kb

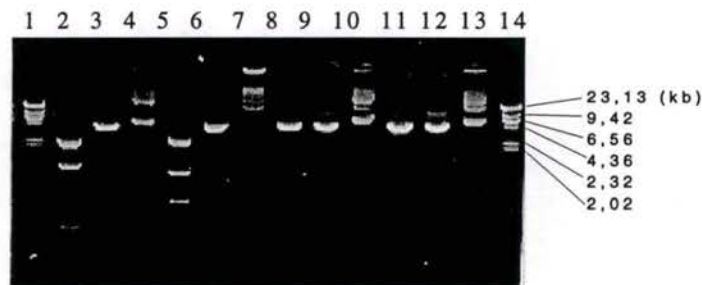


Figure III.3.) Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1% des restrictions PVUII et ECORI des plasmides contenant FRS-2, APO-J et PRO.

Piste :

- 1 : marqueur de poids moléculaire I
- 2 : restriction par PVUII du plasmide contenant FRS-2
- 3 : restriction par ECORI du plasmide contenant FRS-2
- 4 : plasmide contenant FRS-2 non restreint
- 5 : restriction par PVUII du plasmide contenant APO-J
- 6 : restriction par ECORI du plasmide contenant APO-J
- 7 : plasmide contenant APO-J non restreint
- 8 : restriction par PVUII du plasmide contenant PRO
- 9 : restriction par ECORI du plasmide contenant PRO
- 10 : plasmide contenant PRO non restreint
- 11 : restriction par PVUII du plasmide contenant PRO, autre souche
- 12 : restriction par ECORI du plasmide contenant PRO, autre souche
- 13 : plasmide contenant PRO non restreint, autre souche
- 14 marqueur de poids moléculaire I

<i>SS9</i>	1,1 Kb	2,5 Kb
<i>OST</i>	1,5 Kb	2,5 Kb
<i>APO-J</i>	2 Kb	2,5 Kb
<i>FIB</i>	2 Kb	2,5 Kb
<i>PRO</i>	1,5 Kb	2,5 Kb
<i>SM22</i>	1,1 Kb	2,5 Kb
<i>GTP</i>	1,4 Kb	2,5 Kb
<i>FRS-2</i>	2 Kb	2,5 Kb

Aucune bande n'a été observée pour la restriction du plasmide correspondant à APO-J (figure III.2.). Ceci suggère l'absence du plasmide, supposé être présent dans l'échantillon.

Le plasmide contenant le fragment procollagène présente un profil tout à fait aberrant. En effet, une seule bande, d'environ 5 Kb est observée (figure III.2.).

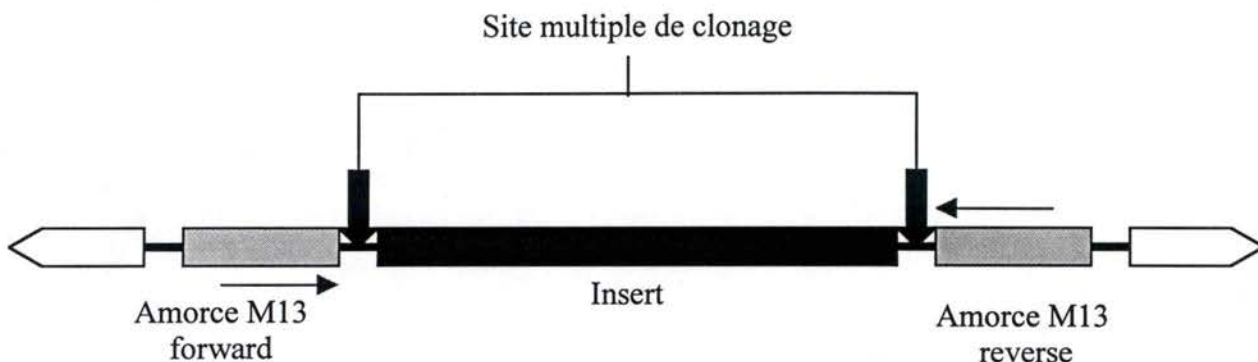
Pour le plasmide contenant le fragment FRS-2, un profil avec une bande de 2,5 Kb et une autre de 1,4 Kb a été observée. Cette dernière est inférieure à la taille attendue de l'insert, soit 2 Kb (figure III.2.).

Pour caractériser les inserts n'ayant pas donné le résultat attendu (PRO, FRS-2 et APO-J), d'autres restrictions ont été réalisées sur des plasmides nouvellement préparés. Ces restrictions ont été réalisées avec les enzymes PVU II et ECOR1. L'enzyme ECOR1 coupe le plasmide en un seul endroit, ce qui induit sa linéarisation. Les plasmides restreints par ECOR1 doivent donc présenter une taille de 2,9 Kb à laquelle doit être ajoutée la taille de l'insert.

10 µl des produits des restrictions ont été déposés sur gel d'agarose 1,2 % ainsi que 10 µl de plasmides non restreints (figure III.3.).

Pour le plasmide contenant le fragment de cDNA de l'APO-J la restriction par PVU II semble donner un profil correct. La bande de 2,5 Kb est bien présente ainsi que les deux autres bandes correspondant à l'insert lui-même restreint, soit 2 Kb total (figure III.3.).

En ce qui concerne le plasmide contenant le fragment FRS-2, une bande de 2,5 Kb est observée. Les deux autres bandes correspondent à l'insert restreint, dont les tailles additionnées donnent 2 Kb, ce qui correspond à la taille attendue (figure III.3.).



Utilisation des amorces M13 pour l'amplification des inserts

Figure III.4.) Représentation schématique de la PCR réalisée avec les amorces M13 situées de part et d'autre du site de clonage du plasmide Bluescript SK. Il y a amplification du site de clonage et de l'insert.

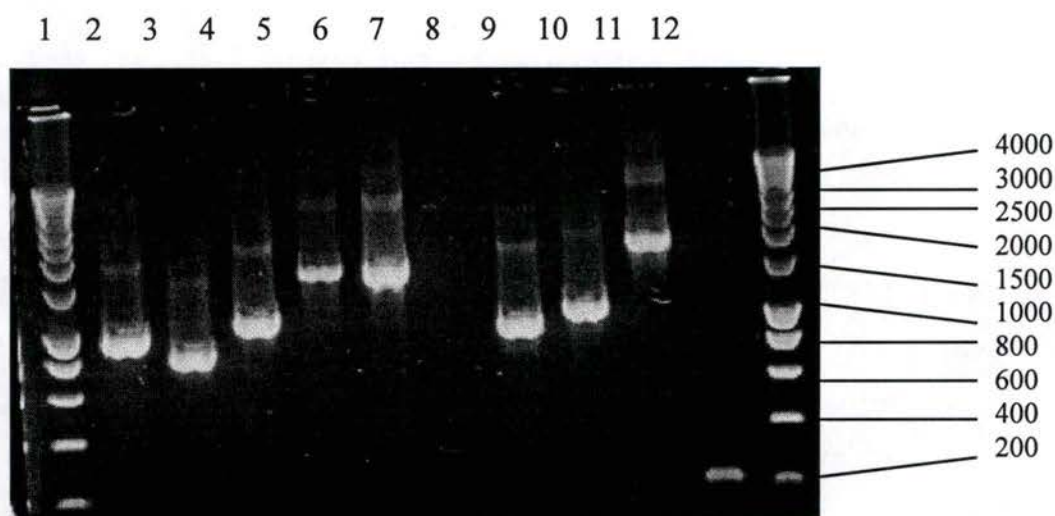


Figure III.5.) Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% de l'amplification par PCR des inserts.

10 µl de chaque PCR ont été déposés sur le gel.

- Piste 1 : marqueur de poids moléculaire Smart Ladder
- Piste 2 : cytochrome c oxydase (1,2 Kb)
- Piste 3 : SS9 (0,9 Kb)
- Piste 4 : ostéonectine (1,3 Kb)
- Piste 5 : APO J (1,7 Kb)
- Piste 6 : fibronectine (1,8 Kb)
- Piste 7 : procollagène (1,3 Kb)
- Piste 8 : SM22 (0,9 Kb)
- Piste 9 : GTP (1,2 Kb)
- Piste 10 : FRS-2 (1,8 Kb)
- Piste 11 : blanc PCR
- Piste 12 : marqueur de poids moléculaire Smart Ladder

En restriction ECOR1, les plasmides contenant les fragments APO-J et FRS-2 présentent une seule bande, correspondant à la linéarisation du plasmide. La bande du plasmide contenant le fragment APO-J est à la taille attendue, soit plus ou moins 4 Kb. Celle pour le plasmide contenant le fragment FRS-2, est également de la taille attendue (figure III.3.).

Les profils de restriction par ECORI et PVUII du plasmide contenant le fragment de cDNA de l' α -1(I) procollagène sont toujours aberrants (figure III.3.).

B.2.) PCR

Dans un second temps, nous avons voulu vérifier l'intégrité des plasmides contenant les cDNA d'intérêt en les amplifiant par PCR. Ceux-ci étant clonés dans un même plasmide, les amorces M13 « forward » et « reverse » du plasmide Bluescript SK seront utilisées dans tous les cas (Figure III.4.). Ces amorces (reprises dans le tableau ci-dessous), situées de part et d'autre du site multiple de clonage (SMC), permettent l'amplification de l'insert cloné à l'intérieur de ce dernier. Les tailles observées sur gel après PCR devront être celles des inserts auxquelles on ajoute 0,2 Kb du SMC.

<i>Nom</i>	<i>Séquence</i>	<i>T_m</i> (2AT+ 4GC)	<i>Nombre de bases</i>
M13 forward	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	52.0°C	17
M13 reverse	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'	56.0°C	19

Pour l'analyse des amplicons, 10 μ l de chaque réaction PCR ont été déposés sur gel d'agarose 1,2 %.

Les tailles des bandes observées sur le gel correspondent aux attentes pour APO-J, OST, FIB, SM22, SS9, GTP, FRS-2 et CCOX (figure III.5.). Le tableau ci-dessous reprend les tailles attendues pour chaque insert :

<i>Inserts</i>	<i>Tailles attendues</i>
CCOX	1,2 Kb
SS9	0,9 Kb
OST	1,3 Kb

APO-J	1,7 Kb
FIB	1,8 Kb
PRO	1,3 Kb
SM22	0,9 Kb
GTP	1,2 Kb
FRS-2	1,8 Kb

Aucune bande n'est visible pour le procollagène : il n'y a pas eu d'amplification.

La connaissance des séquences des ADNc des gènes d'intérêt est une condition primordiale pour l'élaboration des trappeurs. De ce fait, un séquençage des inserts a été effectué sur chacun des plasmides.

Après ces expériences préliminaires, nous pouvons donc dire que tous les plasmides sont corrects et, de ce fait, utilisables pour nos futures expériences, à l'exception de celui qui contient le cDNA de l' α -1(I)-procollagène.

B.3.) Séquençage

Les mêmes amorces M13 ont été utilisées pour le séquençage. L'amorce M13 sens ("forward") permet de séquencer le brin antisens et l'amorce M13 antisens ("reverse") le brin sens. Une fois le séquençage effectué, les séquences partielles obtenues ont été comparées avec les banques de données d'acides nucléiques grâce au programme BLAST.

Les valeurs (E-value) données par ce programme sont des probabilités de reconnaissance fortuite. C'est la probabilité que les deux séquences alignées ne soient pas identiques. Plus la probabilité est faible, plus l'identité sera très élevée.

De cette manière six séquences ont été déterminées. La GTP, SM22, CCOX, APO-J, OST et FIB ont été identifiées avec une haute probabilité. Dans le tableau ci-dessous sont reprises les "E-Values" de chaque séquence correctement reconnue :

<i>Séquences</i>	E-Value
<i>CCOX</i>	10^{-115}
<i>GTP</i>	0,0
<i>OST</i>	9.10^{-93}

<i>FIB</i>	10^{-137}
<i>APO-J</i>	0,0
<i>SM22</i>	2.10^{-59}

Pour SS9, le séquençage a donné de bons résultats. Néanmoins il est inconnu dans les banques consultées. SS9 est, de fait, une nouvelle séquence codante dont la fonction est toujours inconnue (Gonos *et al.*, 1998). Un séquençage total du cDNA aurait donc été nécessaire pour pouvoir élaborer un trappeur, cependant, nous n'avons pas persévéré compte tenu du temps imparti pour ce travail.

Le séquençage du procollagène n'a donné aucun résultat, ce qui était prévisible vu les résultats précédents.

FRS-2, malgré plusieurs essais, n'a pu être séquencé.

La technique de séquençage utilisée dans le paragraphe II.G. a été optimisée. Nous avons changé plusieurs paramètres comme le séchage du culot final sous-vide ou à l'air libre, la quantité du mix PCR, les températures, l'ajout d'acétate de sodium.... Même en utilisant ce protocole optimisé, le procollagène et FRS-2 n'ont pu être séquencés. Ils ne seront donc pas pris en compte dans nos expériences futures.

En conclusion, les six gènes que nous sommes parvenus à séquencer seront utilisés dans la suite de ce travail pour mettre au point la biochips. Ces six gènes sont : la sous-unité III de la cytochrome c oxydase, la fibronectine, l'ostéonectine, la GTP binding protein, l'apolipoprotéine J et SM22.

C.) Synthèse des ADN-trappeurs

Le séquençage des différents inserts nous a permis de définir les séquences des amorces permettant la synthèse par PCR de nos trappeurs. Ces amorces devront être de taille et de composition proche. Ce afin d'obtenir une température de « melting » (T_m) analogue pour chaque paire d'amorces. Les amorces « sens » seront aminées à leur extrémité 5' afin de permettre leur couplage sur les lames de verre.

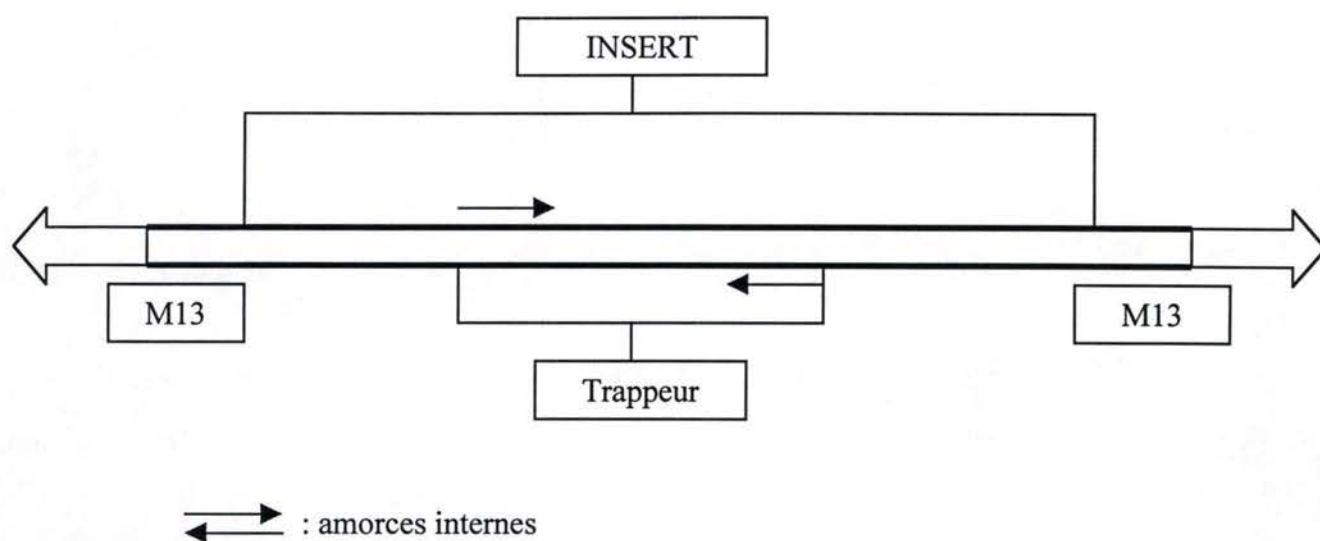


Figure III.6.) Représentation schématique de la situation des amorces utilisées pour la production des ADN-trappeurs.

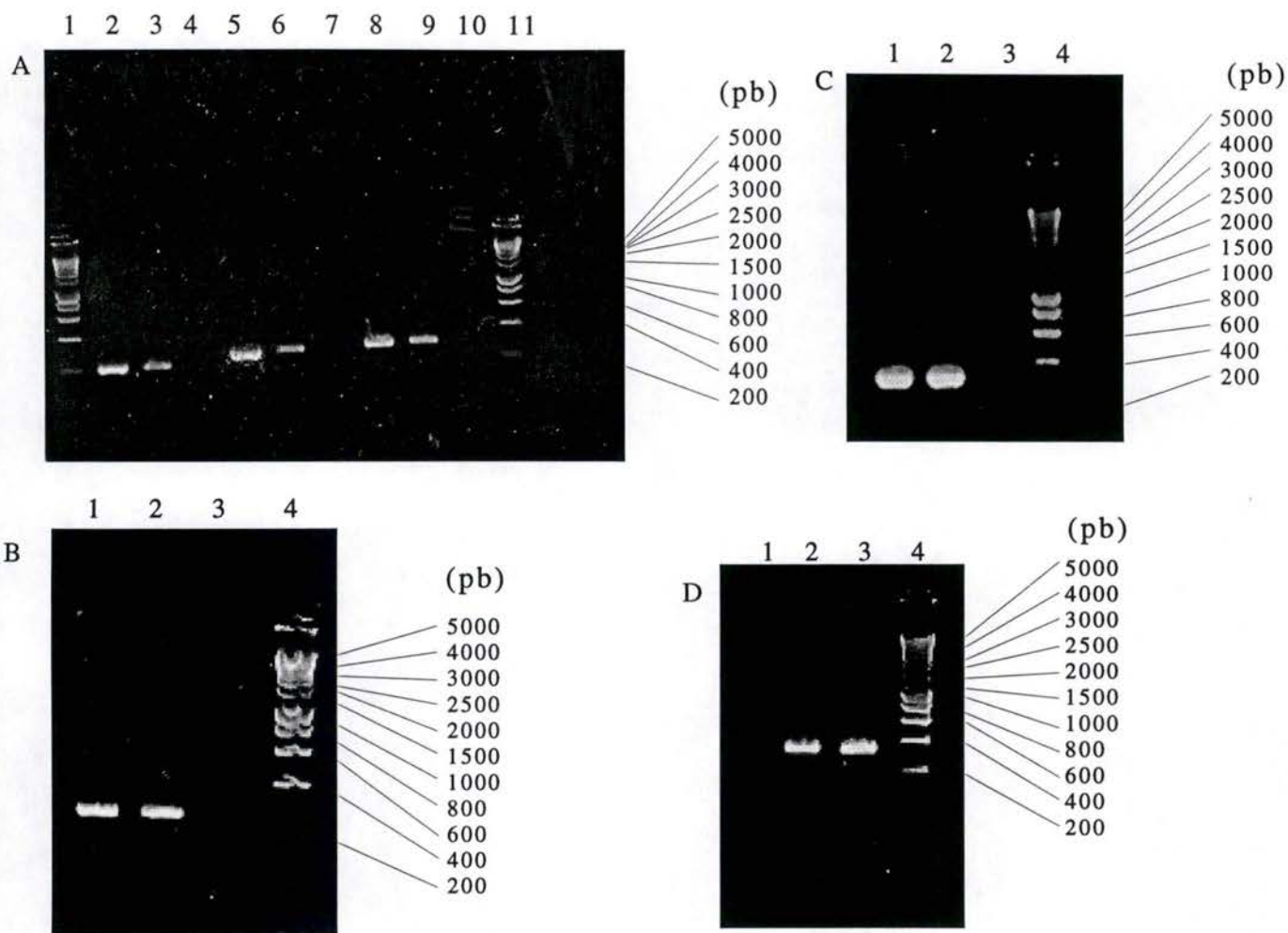


Figure III.7.) Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % des produits PCR pour la synthèse des trappeurs. Deux répliquats et un blanc pour chaque insert. 10 μ l de chaque PCR ont été déposés

A

1 : Smart Ladder
2 : GTP (230 pb)
3 : GTP (230 pb)
4 : GTP (blanc)
5 : SM22 (283 pb)
6 : SM22 (283 pb)
7 : SM22 (blanc)
8 : OST (309 pb)
9 : OST (309 pb)
10 : OST (blanc)
11 : Smart Ladder

B

1 : Smart Ladder
2 : FIB blanc
3 : FIB (270 pb)
4 : FIB (270 pb)

C

1 : CCOX (340 pb)
2 : CCOX (340 pb)
3 : Smart Ladder

D

1 : APO-J (blanc)
2 : APO-J (297 pb)
3 : APO-J (297 pb)
4 : Smart Ladder

Les trappeurs seront du même ordre de taille se situant entre 230 et 340 pb. En effet, si les tailles sont proches, les conditions d'hybridation pourront être similaires pour chacun des trappeurs.

Les séquences des amorces permettant cette synthèse sont reprises dans le tableau ci-dessous.

<i>Noms des amorces</i>	<i>Séquence 3' → 5'</i>	<i>T_m</i> (2AT+ 4GC)	<i># bases</i>
APOJ-S	CGGCTCGGGGCTGGTTGGTC	70.0°C	20
APOJ-AS	ATGAGGCTGCGGACCAAGCG	66.0°C	20
CCOX-S	CATCACAGCCTAATAGAAGG	58.0°C	20
CCOX-AS	ATCCTCATCAATAGATAGAAAC	58.0°C	22
Fibro-S	GCGATCCCCATGAAGCAACGTGT	72.0°C	23
Fibro-AS	CGTCCAACGGCATGAAGCATTCAA	72.0°C	24
SM22-S	TGGAGATCCCAACTGGTTTAT	60.0°C	21
SM22-AS	ATGTGCAGTCATCTTTGCCC	60.0°C	20
GTP-S	CCATCTCTGTGATCCTGTTC	60.0°C	20
GTP-AS	GTAGCAGTAGTGACGCCCAT	62.0°C	20
OST-S	CTTGGGCAAGGACGCTGTGA	64.0°C	20
OST-AS	TTGAGTCTCACTTTCCTGTAGC	64.0°C	22
GAPDH-S	CGTCTTCACCACCATGGAGA	62.0°C	20
GAPDH-AS	CGGCCATCACGCCACAGTTT	64.0°C	20

Une représentation schématique de la PCR se trouve en figure III.6.

Pour la synthèse de chaque trappeur, deux réplicats ainsi qu'un blanc PCR ont été réalisés. 10 µl de chaque produit PCR ont été déposés sur un gel d'agarose 1,2 %.

Les profils d'électrophorèse des trappeurs synthétisés par PCR à partir de ces amorces internes aux inserts correspondent aux tailles attendues (Figure III.7.). Le trappeur de la CCOX à une taille de 340 pb (III.7.C), celui d'APO-J de 297 pb (III.7.D), celui de l'OST de 309 pb (III.7.A), celui de la FIB de 270 pb (III.7.B), celui d'SM22 de 283 pb (III.7.A) et celui de la GTP de 230 pb (III.7.A).

Chaque produit PCR a été purifié et quantifié.

La position des trappeurs à l'intérieur de la séquence des gènes est représentée en annexe.

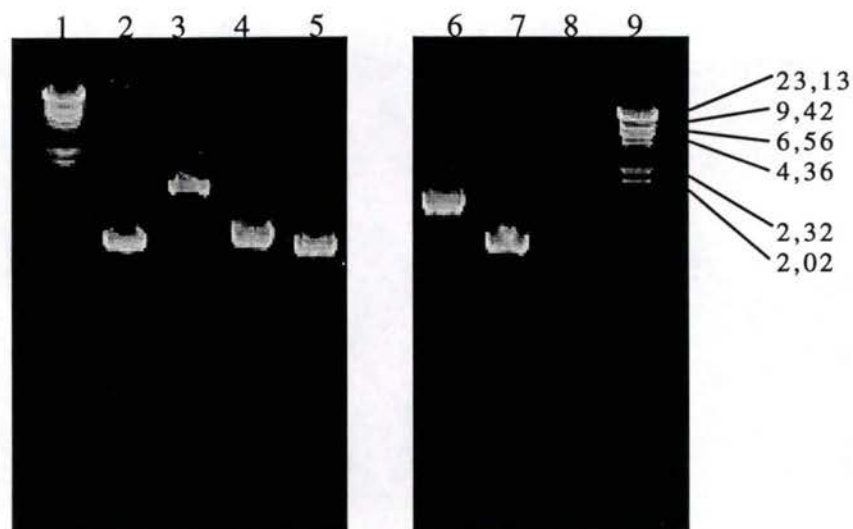


Figure III.8.) Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % des produits PCR pour la synthèse des cibles tests.

Piste :

- 1 : marqueur de poids moléculaire I
- 2 : CCOX (1,2 Kb)
- 3 : FIB (1,8 Kb)
- 4 : OST (1,3 Kb)
- 5 : SM22 (0,9 Kb)
- 6 : APO-J (1,7 Kb)
- 7 : GTP (1,2 Kb)
- 8 : blanc PCR
- 9 : marqueur de poids moléculaire I

En plus de ces six gènes, deux autres séquences trappeurs seront ajoutées au damier. L'une servant de contrôle négatif de l'hybridation (partie de séquence du cytomégalo virus humain), et l'autre de standard interne (glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase). De nombreuses expériences utilisent cet « house-keeping gene » comme standard interne (Kr Se *et al*, 1999). En effet, la présence sur les damiers d'un gène dont l'expression ne varie pas est nécessaire pour normaliser les variations obtenues. La séquence trappeur CMV sera synthétisée par PCR à partir d'un plasmide PAT154 contenant l'exon 4 de HCMV.

La séquence trappeur pour la GAPDH sera synthétisée à partir d'un produit de RT-PCR réalisé sur des ARNm de fibroblastes IMR-90 (C. Fripiat).

D.) Synthèse des ADN-cibles tests

Les ADN-cibles tests pour les optimisations de l'hybridation sur les damiers seront synthétisés par PCR en employant les amorces M13 biotinylées. Cette PCR a été réalisée sur les six plasmides suivant : CCOX, SM22, OST, FIB, APO-J et GTP. 10 µl de chaque PCR seront déposés sur un gel d'agarose 1,2 %.

Le gel réalisé après la PCR est présenté à la figure III.8. Les résultats doivent être les mêmes que ceux obtenus lors de l'analyse des plasmides par PCR (voir paragraphe A.2.). Les tailles correspondent aux attentes.

Chaque produit a été purifié et quantifié afin de pouvoir contrôler la quantité qui sera hybridée sur les damiers.

Dans le tableau récapitulatif ci-dessous sont données les tailles des trappeurs et des cibles.

<i>GENES</i>	<i>TRAPPEURS</i>	<i>CIBLES</i>
CCOX	340 pb	1,2 Kb
APO J	297 pb	1,7 Kb
OST	309 pb	1,3 Kb
FIB	270 pb	1,8 Kb
SM22	283 pb	0,9 Kb
GTP	230 pb	1,2 Kb

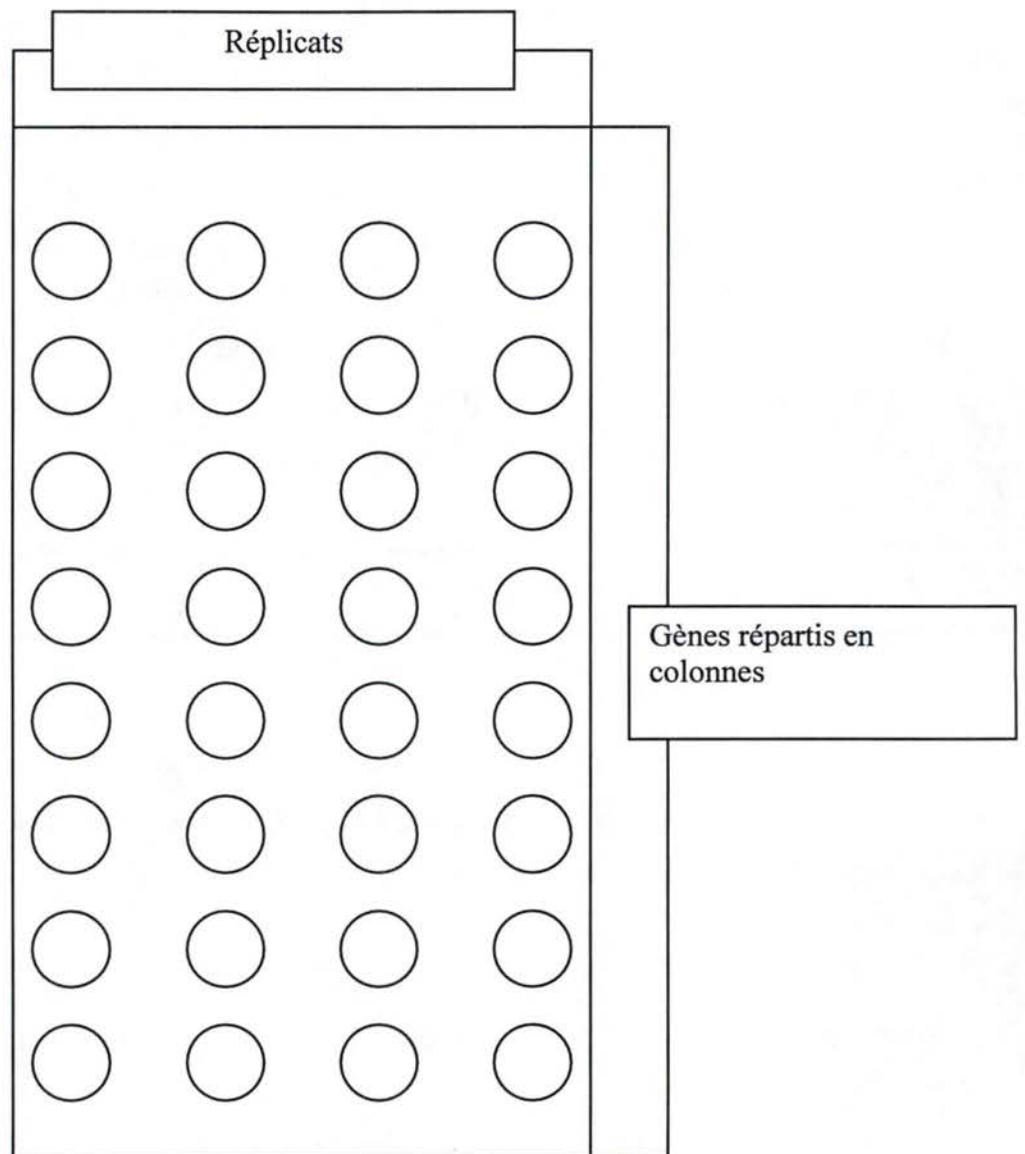


Figure III.9.) Représentation schématique du microdamier. Le nombre de gène ainsi que l'ordre de ceux-ci ne seront pas identiques d'une expérience à l'autre. Il y aura trois ou quatre réplicats.

GAPDH	300 pb
CMV	257 pb

E.) Fixation des trappeurs sur le verre

Les micro damiers ont été réalisés de la manière suivante : chaque ligne de spots correspondra à un trappeur, donc à un gène. Il y aura sur le damier quatre ou trois réplicats pour chaque gène, les damiers auront donc quatre ou trois colonnes (figure III.9). Dans un premier temps, il n'y aura pas de contrôle négatif CMV. En revanche, seule une cible sera déposée par lame. Ce faisant il n'y aura qu'un seul gène allumé, les autres ne devant montrer aucun signal feront donc office de contrôles négatifs. Cela permettra de mesurer la spécificité du biochips.

Quand l'hybridation sera réalisée à partir d'ADNc provenant d'une rétro-transcription sur des extraits d'ARN, la GAPDH, contrôle interne pour la normalisation, et une partie de CMV servant de contrôle négatif, seront ajoutés.

F.) Optimisation de l'hybridation

Les ADN-cibles synthétisés par PCR nous permettront de réaliser des tests d'hybridation sur les différents trappeurs composants les micro-damiers. Afin d'optimiser l'hybridation sur ces damiers, différents paramètres d'hybridation seront étudiés.

F.1.) Influence de la température.

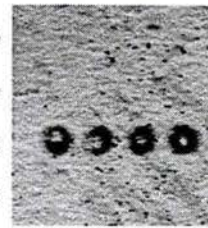
a.) Conditions

Le but de cette expérience est d'étudier l'effet de la température sur l'hybridation afin de déterminer la température optimale.

Les différentes températures testées sont 65°C, 70°C et 85°C. Ce test a été réalisé sur un damier comportant quatre trappeurs (GTP, FIB, OST, SM22), mais seul l'ADN-cible de l'ostéonectine a été hybridée aux trois températures.

Hybridation à 65°C

Gtp
Fib
Ost
Sm22



Hybridation à 70°C.

Gtp
Fib
Ost
Sm22



Hybridation à 85°C

Gtp
Fib
Ost
Sm22

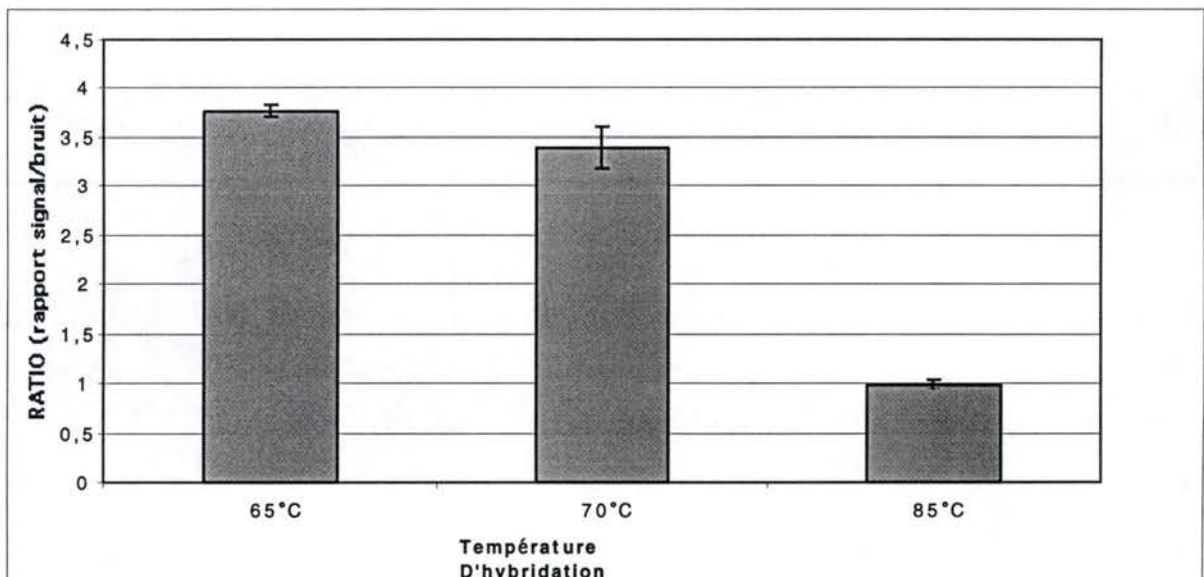


Figure III.10.: Scanning des damiers et quantification des signaux d'hybridation. Influence de la température sur l'hybridation. 30 fmoles de cible ostéonectine ont été hybridées à trois températures différentes sur des damiers portant les trappeurs GTP, FIB, OST et SM22. Les valeurs sur le graphique sont exprimées en RATIO, c'est-à-dire le rapport signal/bruit.

La quantité de cibles hybridée est de 30 fmoles pour toutes les températures.

b.) Résultats et analyse

Après révélation par précipité de sels d'argent, nous pouvons visualiser la diminution de l'intensité du signal au fur et à mesure que la température augmente (Figure III.10.). Les résultats sont confirmés après quantification (avec le logiciel NIH Image) des signaux d'hybridation.

Pour les autres expériences, la température de 65°C a été utilisée, car c'est cette température qui donne les signaux les plus élevés. Il est à noter que pour toutes les températures testées, la spécificité de l'hybridation est parfaite puisque l'ADN-cible OST ne s'accroche que sur le trappeur lui correspondant.

F.2.) Etude de la spécificité

a.) Conditions

Le but de cette expérience est de déterminer la spécificité des trappeurs. Il faut s'assurer que chaque trappeur ne reconnaisse que leur cible, sans quoi les réactions croisées empêcheraient toute tentative d'analyse.

L'expérience a été réalisée avec quatre gènes : GTP, FIB, OST, SM22. Chaque damier est composé de quatre colonnes (réplicats) et de quatre lignes (gènes). Sur chaque lame, trois damiers ont été réalisés. Sur une lame n'a été déposée qu'une seule cible, à des quantités différentes pour chaque damier : 100, 30 et 10 fmoles.

La température utilisée est 65°C, comme déterminée dans l'expérience précédente.

b.) Résultats et analyse

A la figure III.11. et 12. sont présentés les résultats de la révélation à l'argent et de la quantification.

D'une part, le signal correspond à la cible hybridée.

Il y a donc très peu d'hybridations non spécifiques. On peut supposer que la faible hybridation non spécifique provient d'une insuffisance des lavages de l'aiguille déposant les trappeurs lors de la fixation car cette non spécificité est visible uniquement sur la ligne qui

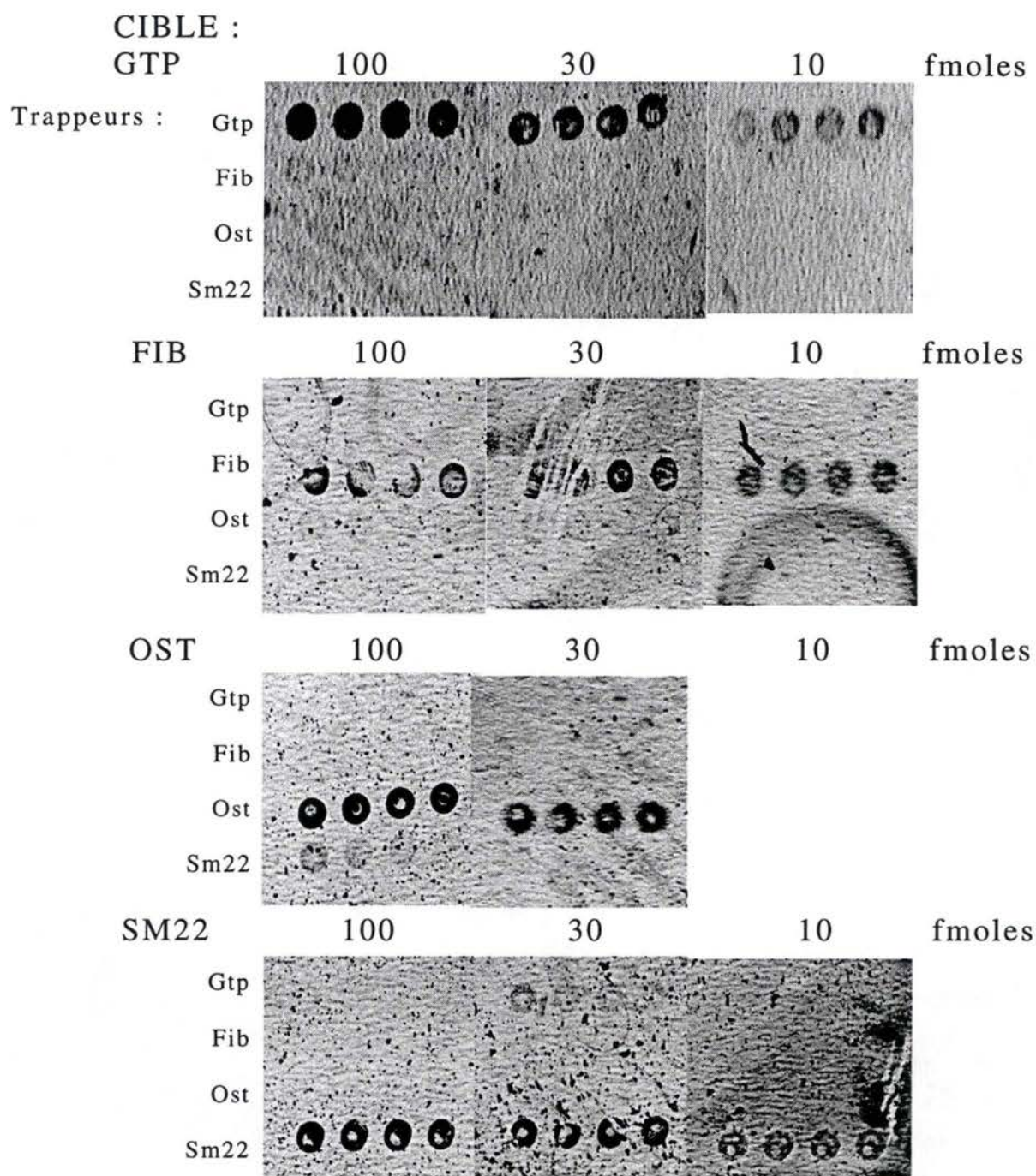


Figure III.11.: Scanning des damiers de l'expérience sur de la spécificité d'hybridation à 65°C. Une seule cible par damier portant quatre types de trappeurs différents. Chaque cible est hybridée à 3 quantités différentes : 10, 30 et 100 fmoles. Le troisième damier de la lame "OST" n'est pas représenté sur cette figure car un précipité central rendait impossible son interprétation.

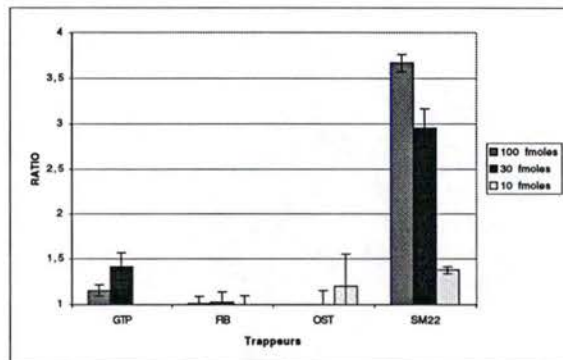
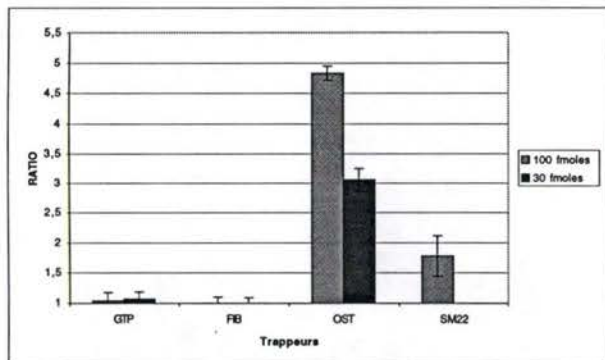
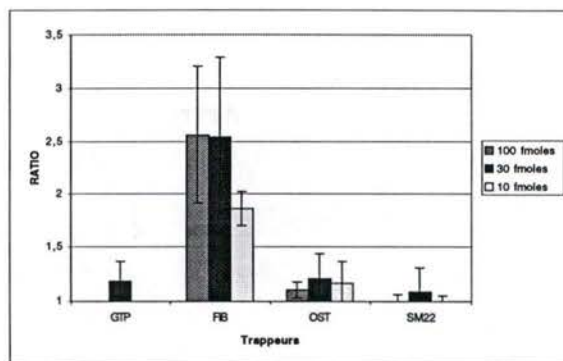
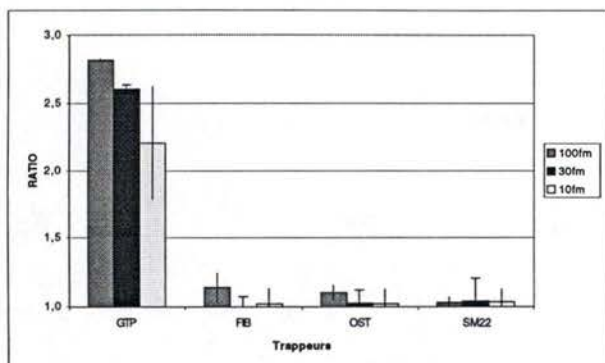


Figure III.12.) Quantifications des lames de l'expérience sur la spécificité. Quatre gènes sont présents par damier. Trois quantités de cible sont hybridées : 100, 30 et 10 fmoles. Pour chaque lame, c'est-à-dire pour chaque cible, nous observons bien que seuls les trappeurs correspondant sont significativement allumés, et ce à une intensité proportionnelle à la quantité de cible hybridée. La température d'hybridation est de 65°C.

suit l'hybridation positive, cette ligne étant déposée juste après le trappeur positif. Il resterait donc de l'ADN-trappeur précédent sur l'aiguille lors du dépôt suivant. Il s'agit donc de contaminations croisées de trappeurs lors de la fixation. Les lavages des aiguilles devront être optimisés pour les autres expériences.

Les problèmes de la révélation à l'argent sont ici évidents. L'argent précipite très facilement en présence de poussière ou dans le cas où il y a eu évaporation de la solution d'hybridation durant l'incubation. Ceci explique la variabilité du bruit de fond et l'absence du troisième damier de la troisième lame, qui présentait un précipité noir central rendant impossible toute analyse du damier. Cette variation devra être prise en compte lors de la quantification des spots. En effectuant un rapport signal/bruit, on peut éliminer de l'intensité des spots, celle du bruit de fond, et, de ce fait, obtenir l'intensité du signal spécifique.

L'influence de plusieurs paramètres tels que la salinité, le temps d'hybridation, la concentration en trappeurs,...ont été préalablement étudiés et optimisés (Zammatteo, 1998) et ne seront pas réétudiés ici.

Maintenant nous pouvons étudier la sensibilité de la méthode, puisque les conditions expérimentales ont été optimisées.

F.3.) Etude de la sensibilité

a.) Conditions

Il est important de définir la sensibilité des damiers. En effet, un des intérêts de la biochips est de diminuer la quantité de matériel de départ à utiliser. Il faut donc que notre biochips soit sensible. Lors de cette expérience, différentes quantités d'ADN-cibles seront hybridées sur nos damiers. Nous savons déjà, de par l'expérience sur la spécificité, que nous pouvons détecter 10 fmoles de cibles. Nous reprendrons une quantité déjà testée, 30 fmoles. 1 fmole de cible sera testée simultanément.

La sensibilité sera testée pour les six gènes d'intérêt, à la température d'hybridation de 65°C.

Quantité d'ADN-cible : 30 fmoles

1 fmoles

Cibles

Trappeurs
FIB CCOX APO-J GTP OST SM22



FIB CCOX APO-J GTP OST SM22



Figure III.13.) Scanning de l'expérience sur la sensibilité des damiers portant six gènes différents. Hybridation à 65°C en présence de deux quantités de cibles : 30 et 1 fmoles pour les six gènes.

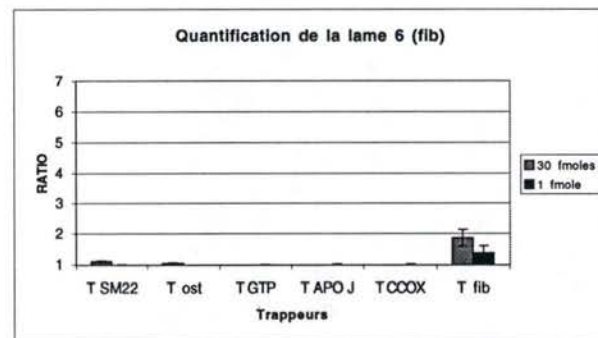
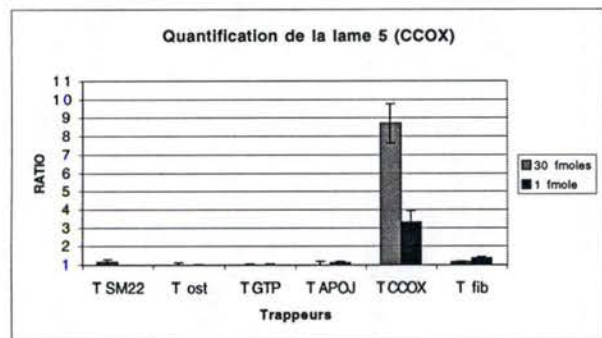
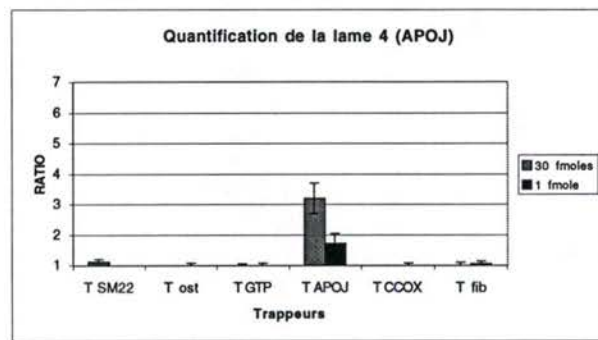
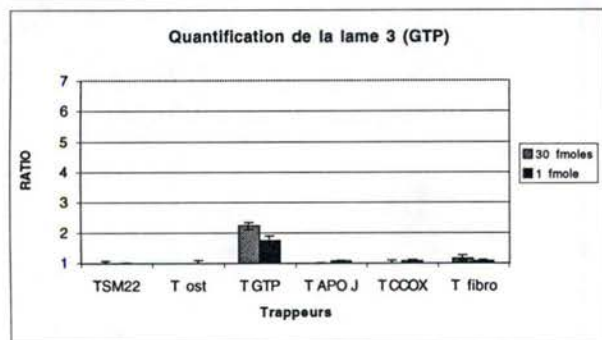
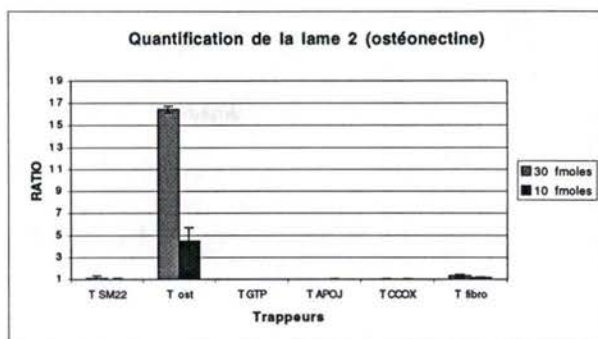
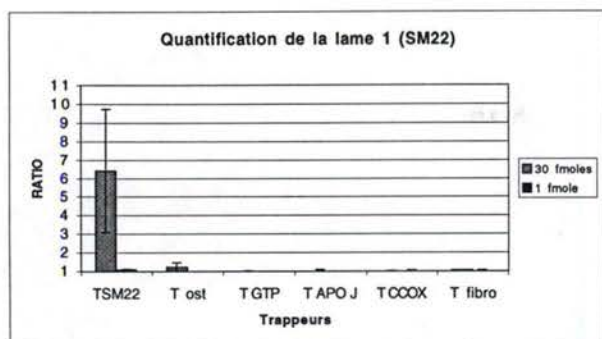


Figure III.14.) Quantifications des signaux obtenus lors de l'expérience sur la sensibilité des damiers. Les valeurs présentées dans ces graphiques sont exprimées en RATIO, c'est à dire le rapport signal/bruit.

b.) Résultats et analyse

Lors de cette expérience, les lavages de l'aiguille ont été effectués dans une quantité plus importante de solutions de lavages (acétone et eau), cela a suffi à éliminer la présence des contaminations croisées observées dans l'expérience décrite au paragraphe précédent.

Les résultats sont présentés sur la figure III.13 et 14. Nous observons que l'intensité de l'hybridation diminue proportionnellement avec la quantité de cibles hybridées. Un signal est encore détectable pour 1 fmoles. Néanmoins, pour la fibronectine et l'APO-J, l'intensité est très faible. Sur notre damier, ces deux gènes jouent donc un rôle de facteur limitant puisque ce sont les sensibilités les plus basses qui déterminent celle de tout le damier. Donc nous considérons que la limite se situe aux environs de 1 fmole pour 5 μ l. Pour les autres trappeurs, les intensités sont encore suffisamment élevées, ce qui voudrait dire que nous pourrions détecter de plus petites quantités de cibles.

Ces différences de sensibilité entre les cibles peuvent être en partie expliquées par la variation des tailles des ADN cibles hybridés. La fibronectine, 1,8 Kb, et l'APO-J, 1,7 Kb, sont les plus grandes de toutes les cibles, et produisent les signaux les moins intenses. L'hybridation pourrait être influencée par la taille de l'ADN-cible, c'est à dire par le fait qu'un long fragment cible formerait plus de structures secondaires. De ce fait, il serait moins accessible pour l'hybridation sur son trappeur. Enfin, la taille du trappeur doit aussi avoir une influence sur l'hybridation. Il semblerait logique de penser qu'un trappeur de grande taille puisse être plus facilement accessible par l'ADN-cible correspondant. Cette hypothèse permettrait d'expliquer les fortes intensités obtenues pour la CCOX et l'OST, qui possèdent les plus grands trappeurs.

<i>GENES</i>	<i>Tailles des ADN-trappeurs</i>	<i>Tailles des ADN-cibles</i>
CCOX	340 pb	1,2 Kb
APO J	297 pb	1,2 Kb
OST	309 pb	1,3 Kb
FIB	270 pb	1,8 Kb
SM22	283 pb	0,9 Kb
GTP	230 pb	1,2 Kb

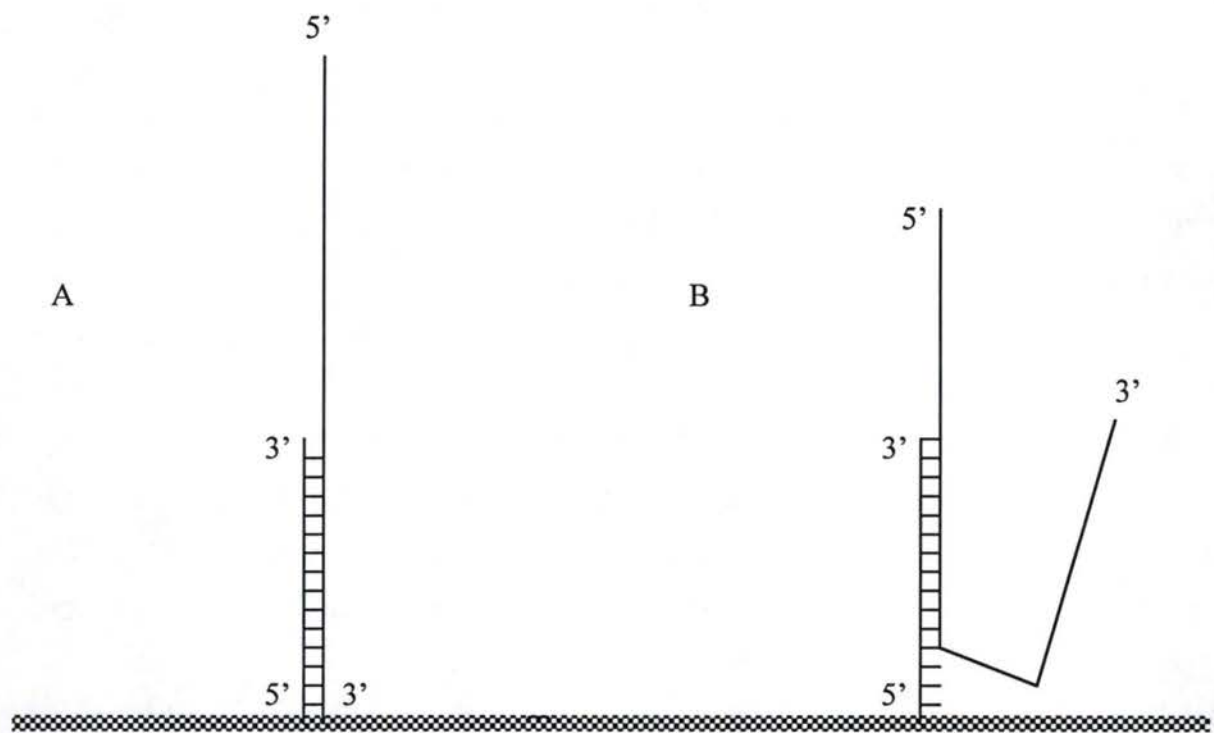


Figure III.15.) Hybridation des cibles sur leur trappeur. En A, la séquence trappeur est complémentaire de l'extrémité 5' de la cible, l'hybridation est favorisée. En B, la séquence du trappeur reconnaît le milieu de la cible, il y a destabilisation de l'hybridation.

Ceci ne peut être affirmé que dans le cas d'une étude systématique sur l'influence de la taille de l'ADN cible et de l'ADN trappeur sur l'hybridation. Cette étude n'a pas été effectuée. Dans le cas du dosage des ARNm les ADN cibles ne seront plus les ADN doubles brins d'une taille fixe produits par PCR mais bien des ADNc simple brins de taille variable, ceci change donc les paramètres du dosage et influence les rendements d'hybridations.

Une deuxième explication pour ces différences d'intensité est la position du trappeur dans la séquence totale de l'ADN-cible. En effet, si trappeur et cible s'hybrident aux extrémités l'un de l'autre il y a peu de problèmes. Mais si la séquence du trappeur est située plus au centre de l'insert alors des problèmes stériques pourraient déstabiliser l'hybridation (Figure III.15.). Les distances approximatives qui séparent l'extrémité des trappeurs aux extrémités des ADN-cibles sont représentées ci-dessous.

<i>Gènes</i>	<i>Distances approximatives</i>
SM22	190 pb
OST	270 pb
FIB	700 pb
GTP	100 pb
CCOX	200 pb
APO-J	400 pb

La fibronectine et l'APO-J montrent une plus grande distance. Ceci pourrait expliquer son intensité plus faible. Pour les autres, les distances sont comparables et ne permettent pas d'expliquer les différences d'intensités.

Il est à noter que les intensités des spots sont, en général, plus faibles que lors de la première expérience (paragraphe E.2.), à 65°C. Ceci peut être dû à une quantité de trappeur fixée plus petite. Le tampon MES, utilisé à pH 6,5 pour la fixation d'ADN aminé sur le verre aldéhyde, pourrait être à l'origine d'un mauvais rendement de fixation des trappeurs. Ce tampon est très instable, et, de plus, son efficacité est très dépendante du pH. Lors de la fixation, la réaction d'attaque nucléophile entre l'aldéhyde de la lame et l'amine terminale du trappeur est elle aussi sensible au pH. Entre la première expérience et celle-ci, plusieurs semaines se sont écoulées, et même si le MES était conservé à 4°C, ce temps a suffi pour qu'il se dégrade.

Une deuxième hypothèse peut être émise concernant cette baisse d'intensité des signaux. Les aldéhydes présents sur les lames peuvent, à l'air libre, s'oxyder très facilement en acides carboxyliques. La fixation des ADN aminés ne peut alors plus se faire. Au fil du temps, la lame contient donc de moins en moins de sites de fixation pour les trappeurs. De moins en moins de trappeurs sont fixés sur la lame et l'hybridation diminue proportionnellement.

F.4.) Conclusions

Différents paramètres tels que la température, les lavages lors de la fixation sont maintenant optimisés. La température de 65°C sera utilisée pour l'hybridation.

Les ADN-trappeurs sont spécifiques des ADN-cibles directement complémentaires dans les conditions d'hybridations utilisées.

Les optimisations étant réalisées, nous passerons à l'hybridation d'ADNc représentant l'expression génétique des cellules jeunes ou vieilles.

G.) Analyse de l'expression différentielle au cours du vieillissement

L'expression des gènes d'intérêts a été étudiée dans des fibroblastes humains WI-38 vieux et jeunes. Dans un premier temps des ARNm de fibroblastes jeunes, en passage G22, seront rétrotranscrits et les ADNc hybridés sur le damier. Ensuite des ARNm de fibroblastes en passage G45 seront rétrotranscrits et hybridés sur un autre damier.

G.1.) Hybridation d'ADNc de cellules jeunes.

a.) Conditions

Cette expérience a pour but d'analyser l'expression des gènes représentés sur le micro-damier dans des fibroblastes jeunes. Les résultats seront comparés avec ceux obtenus avec des cellules vieilles.

Damiers réalisés après rétro-transcription de :

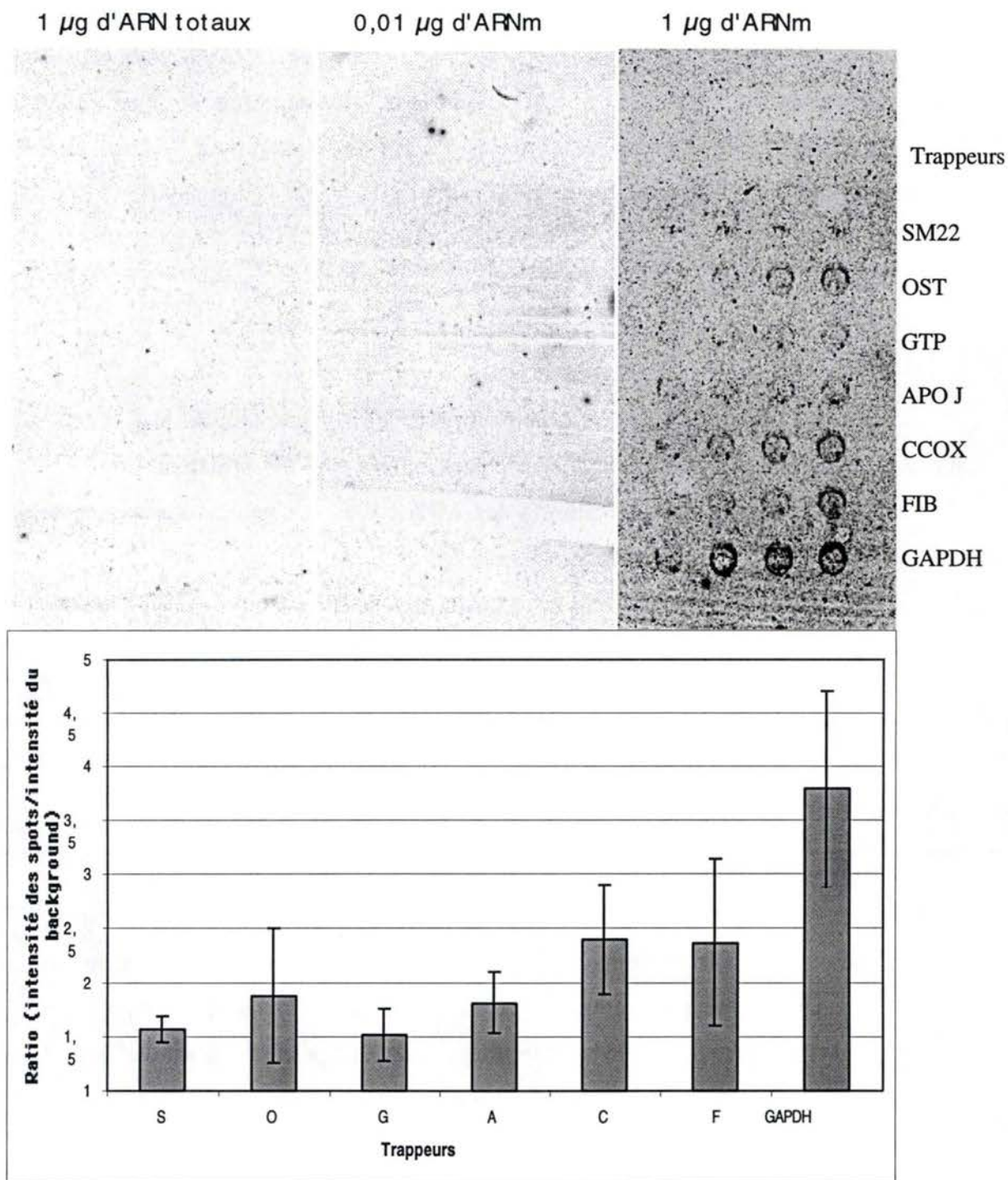


Figure III.16.) Scanning des damiers et quantifications des signaux obtenus lors de l'hybridation d'ADNc issus d'une extraction d'ARN de fibroblastes humains WI-38 en passage 22. Les lignes correspondent aux différents trappeurs, avec 4 réplicats pour chacun. La GAPDH nous sert de contrôle interne pour normaliser les comparaisons puisque ce dernier gène semble ne pas varier selon l'âge de la cellule. Pour le graphique, les RATIO correspondent au rapport signal/bruit. S=SM22, O=OST, G=GTP, A=APO-J, C=CCOX, F=FIB.

Cette expérience a été réalisée en hybridant une population d'ADNc synthétisée à partir d'ARN total ou messagers extraits de fibroblastes WI-38 en passage G22. Trois expériences seront réalisées de front. Différentes rétrotranscriptions ont été réalisées à partir de différentes quantités d'ARN de départ, soit 1 µg d'ARN total, 0,01 µg d'ARNm et 1 µg d'ARNm. Le rendement de la RT est estimé à 50 %, donc 0,005 µg, 0,005 µg et 0,5 d'ADNc ont été obtenus théoriquement après la rétrotranscription de 1 µg d'ARN total, 0,01 µg et 1 µg d'ARNm respectivement. Après rétrotranscription, 1/3 de chaque RT, soit 3 µl, a été hybridé sur des damiers identiques

b.) Résultats

La rétrotranscription de 1 µg d'ARNm a donné un signal en hybridation (figure III.16.). La quantité d'ADNc obtenue pour les autres rétrotranscriptions est probablement trop faible que pour être détectée par le damier. Il faut noter qu'entre les deux valeurs calculées il y a un facteur 100. A ceci il faut ajouter les problèmes de sensibilité cités plus haut, et il est alors possible de prévoir une amélioration de la sensibilité avec, en parallèle, celle des conditions d'hybridations.

L'intensité obtenue pour le gène de la GAPDH est plus élevée que pour les autres gènes analysés. Ceci pourrait s'expliquer en considérant que la GAPDH est le seul trappeur possédant un ADN-cible 100 % identique, puisqu'issus d'un ADNc humain.

Etant donné que les trappeurs ont été synthétisés à partir d'ADNc de rat, il nous semble important d'effectuer des alignements de séquences entre les trappeurs et les ADNc humains afin de déterminer le pourcentage d'identité existant entre ces deux séquences et ce pour chaque trappeur. Le tableau ci-dessous reprend ces pourcentages.

<i>Trappeurs</i>	<i>% d'homologie avec la cible d'ADNc humain.</i>
CCOX	45 %
APOJ	80,7 %
FIB	88,2 %
SM22	78,8 %
GTP	100 %
OST	56,7 %

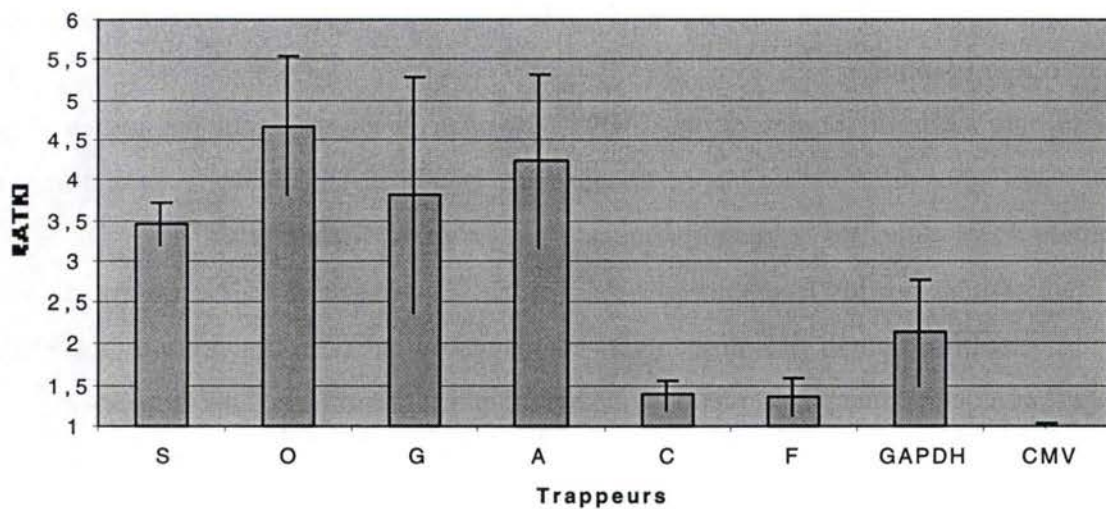
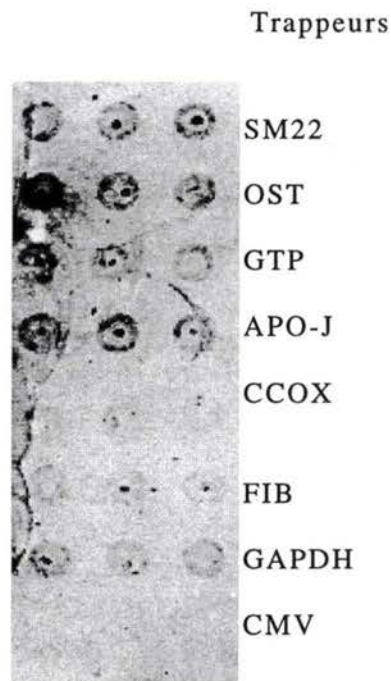


Figure III.17.) Hybridation d'ADNc issus d'une extraction d'ARN de fibroblastes WI-38 en passage G45. Pour le graphique, les valeurs d'intensité sont données en RATIO, à savoir le rapport signal/bruit. Un contrôle négatif d'hybridation a été ajouté, il s'agit d'une séquence de CMV.

La GAPDH sert de contrôle interne pour normaliser les comparaisons. S=SM22, O=OST, G=GTP, A=APO-J, C=CCOX, F=FIB.

La GTP possède elle aussi un trappeur 100% homologue, sans présenter le même signal que la GAPDH. Cependant, il est impossible d'établir une corrélation entre les intensités et les pourcentages d'identités car il y a ici un deuxième facteur, qui est le taux d'expression de chaque gène.

Nous avons montré qu'il est possible de détecter les différents ADNc correspondants aux gènes surexprimés durant le vieillissement dans une population d'ARNm rétrotranscrits. Ce qui est véritablement important c'est de pouvoir réaliser la même expérience sur des cellules vieilles et de comparer ensuite les résultats.

G.2.) Hybridation d'ADNc provenant de cellules vieilles.

a.) Conditions

Le but de cette expérience est d'étudier l'expression des gènes d'intérêts dans des fibroblastes WI-38 en passage G45 et de comparer les signaux obtenus avec ceux de l'expérience précédente.

En considérant les résultats précédents, la quantité nécessaire de matériel à utiliser durant la rétrotranscription est de 1 µg d'ARNm. Après rétrotranscription le tiers du volume final de 9 µl, donc 3 µl, a été déposé sur un damier sur lequel un contrôle négatif, un trappeur d'une séquence de CMV, a été ajouté afin de déterminer si les signaux obtenus sont bien issus d'une hybridation spécifique. Trois réplicats ont été faits pour chaque trappeur.

Par la suite nous pourrions alors déterminer en comparant les expériences effectuées sur les cellules jeunes et vieilles les variations des taux d'expression entre ces cellules.

b.) Résultats et analyse.

Au vu des signaux obtenus, il semble exister une grande variation au niveau de l'expression des gènes analysés (figure III.17.). Des signaux élevés ont été obtenus pour les trappeurs SM22, OST, GTP et APO-J ; et des signaux plus faibles pour les trappeurs CCOX et la fibronectine. L'intensité de la GAPDH est moyenne. Les trappeurs qui présentent une faible intensité, à savoir la CCOX et la FIB, sont ceux dont l'ADN-cible spécifique dépasse

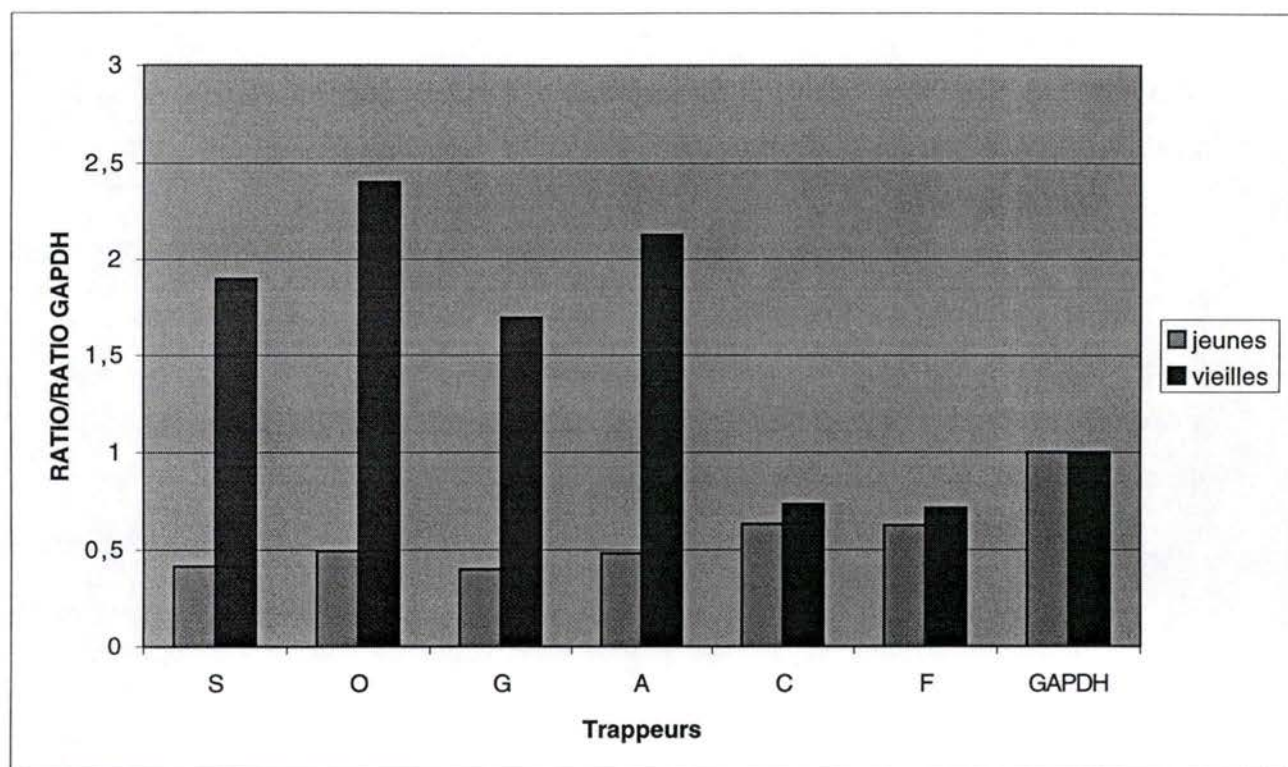


Figure III.18.) Comparaison des signaux d'hybridation obtenus pour les fibroblastes en passage G22 et en passage G45. Toutes les valeurs sont rapportées aux signaux de la GAPDH. Le contrôle négatif n'est pas indiqué car il était de la même valeur que le Background.

S=SM22, O=OST, G=GTP, A=APO-J, C=CCOX, F=FIB.

les 7000 pb. Cette taille d'ADN-cible est peut-être trop grande et pourrait interférer, par encombrement stérique, avec l'hybridation.

L'ADN-cible de la CCOX doit être un ARNm issu d'une partie du génome mitochondrial codant pour plusieurs gènes comme l'ont montré les recherches dans les banques suite au séquençage. La partie reconnue par le trappeur correspond au gène de la sous-unité III de la cytochrome c oxydase. Comme un contrôle négatif de l'hybridation a été ajouté, il est possible de conclure que le trappeur CCOX reconnaît un ADN-cible spécifique.

Un problème est survenu durant cette expérience. Sur le damier des irrégularités dans la précipitation sont présentes, pouvant entraver la quantification. Ces traces peuvent être dues à une infiltration du DPX, produit utilisé pour le scellage des lames lors de l'hybridation. Le DPX est une résine qui durcit à l'air libre, mais elle peut pénétrer sous la lame couvre objet et provoquer ce genre de traces sur la lame. De plus il semble qu'il y ait eu un manque de réaction dans la partie inférieure du damier, puisque les intensités sont très faibles.

Afin d'analyser la variation d'expression de ces gènes au cours du vieillissement, les deux expériences précédentes ont été comparées.

G.3.) Comparaison de l'expression des gènes dans les cellules jeunes et vieilles.

Lors de la comparaison des résultats (figure III.18.) obtenus dans les deux expériences précédentes, soit l'expression de six gènes dans des cellules jeunes et vieilles, nous observons que les signaux obtenus pour le gène de la GAPDH sont différents d'une expérience à l'autre. Or la GAPDH a justement été choisie parce qu'elle doit donner le même signal quel que soit l'âge de la cellule. Ceci peut-être la conséquence la variabilité d'une expérience à l'autre, ou à une erreur de quantification de l'ARN utilisé, ou à une différence de rendement lors des RT. Afin de comparer les deux expériences nous avons « normalisé » les signaux de la GAPDH en divisant toutes les valeurs obtenues pour les différents gènes par la valeur de la GAPDH, et ce pour chaque expérience. De cette manière, les résultats seront exprimés en relation avec le taux d'expression de la GAPDH.

Dans ce tableau sont repris tous les rapports d'expression :

	HEF Vieux/jeunes (Northern Blot)	HEF vieux/jeunes (biochips)
SM22	4,7	4,6

OST	1,9	4,8
GTP	3,3	4,2
APO J	2,4	4,4
CCOX	1,8	1,2
FIB	5,5	1,1

Une augmentation significative d'expression des gènes SM22, OST, GTP et APO-J a pu être mise en évidence. Le niveau d'expression de ces gènes est bien plus importante dans les cellules vieilles par rapport aux cellules jeunes.

P. Dumont, au cours de ses expériences sur les mêmes gènes durant le vieillissement en utilisant la technique de Northern Blot, a montré qu'entre des fibroblastes WI-38 jeunes et âgés il y avait des différences d'expression. Nous avons aussi indiqué dans le tableau les valeurs qu'il a obtenues par mesure de l'expression en Northern Blot.

Pour les quatre premiers gènes, nous avons obtenu effectivement une augmentation importante de l'expression chez les cellules vieilles.

Les valeurs pour la CCOX et FIB ne correspondent pas aux Northern Blots. Plusieurs explications sont possibles. Comme énoncée plus haut l'hypothèse de l'encombrement stérique pourrait jouer un rôle. Les cibles ne pourraient pas s'hybrider avec un rendement correspondant à leur quantité dans la population d'ADNc puisque leur taille constituerait un obstacle pour toute hybridation significative. D'autre part, un problème technique lors des réactions n'est pas à exclure.

Il semblerait que la technique des biochips soit applicable à l'analyse de l'expression différentielle, mais il est nécessaire de continuer à améliorer la reproductibilité des résultats d'une expérience à l'autre, sans quoi la mise en évidence d'une différence d'expression sera biaisée.

Ces expériences doivent être considérées comme une première tentative d'utilisation de cette nouvelle technologie.

Chapitre IV : Conclusions et Perspectives

A.) Conclusions et perspectives

Le but de ce mémoire était donc de définir si la technique des biochips peut être appliquée à l'étude des modifications de l'expression génétique qui accompagnent le vieillissement normal des fibroblastes humains.

Nous avons dans un premier temps analysé les plasmides Bluescript SK dans lesquels étaient clonés neuf gènes dont l'expression varie durant le vieillissement cellulaire. Ces gènes sont la sous-unité III de la cytochrome c oxydase, la fibronectine, l'ostéonectine, l'apolipoprotéine J, SM22, la GTP- α binding protein, SS9, FRS-2 et l' α 1(I)-procollagène.

Il s'est avéré que deux de ces plasmides n'ont pu être séquencés, celui contenant l' α 1(I)-procollagène et celui contenant FRS-2. La synthèse des séquences trappeurs, condition nécessaire à l'élaboration du biochips, n'a pas pu être réalisée pour ces deux gènes. En conséquence, l'expression des gènes FRS-2 et PRO n'a pu être étudiée. Il eût été intéressant, pourtant, d'avoir FRS-2 sur nos damiers car c'est le seul des neuf gènes dont l'expression diminue avec le vieillissement. SS9 est inconnu à ce jour, et nous n'avons pas persévéré dans son séquençage total ce qui nous aurait permis d'élaborer le trappeur nécessaire pour la détection de ce gène dans les échantillon d'ADNc.

Le biochips développé lors de ce travail nous a permis de suivre l'expression des gènes ostéonectine, apolipoprotéine J, Smooth Muscle protein 22 et GTP- α binding protein dans des fibroblastes jeunes et vieux. Une surexpression significative est observée pour ces gènes dans les cellules vieilles. En ce qui concerne l'expression de la fibronectine et de la CCOX, rien ne nous permet de dire qu'il y a un changement dans les cellules vieilles car l'intensité des signaux n'était pas significativement différente. Deux raisons hypothétiques, à savoir un problème technique ou une hybridation affectée par les grandes tailles de ces ADNc ont été émises.

Dans la méthode d'élaboration des biochips utilisée ici, à savoir le dépôt d'ADN-trappeurs préalablement synthétisés, la partie la plus laborieuse, et pourtant la plus cruciale, est justement la synthèse de ces derniers. Les PCR, les séquençages, les restrictions, les purifications, autant de techniques qu'il faut optimiser pour arriver à la fin aux séquences trappeurs.

Même si les optimisations restent nombreuses et difficiles, l'automatisation des expériences sur l'expression différentielle en général et durant vieillissement en particulier est un but intéressant, car une fois la biochips développée et optimale elle permettra une accélération des études. De même la quantité des gènes étudiés en une seule expérience peut être plus élevée que dans n'importe quelle autre technique, et, de ce fait, les comparaisons simultanées d'expression entre tous ces gènes sont possibles et directes.

Mais pour être tout à fait précis dans les expériences il est primordial de standardiser toutes les étapes, de la fixation à la révélation, afin d'obtenir le moins de variabilité possible. La révélation à l'argent étant très sensible aux perturbations. Il est nécessaire de travailler avec du matériel propre, dépourvu de poussière ou de toutes autres traces provoquant des précipitations non spécifiques. Une alternative serait de nettoyer à l'eau distillée et à l'alcool les lames de verre (couvres-objets et portes-objets) juste avant les manipulations. De même pour le scellage de la chambre d'hybridation, il doit être absolu car la moindre évaporation de la solution d'hybridation va provoquer une perturbation dans les signaux. En cela, le scellage au DPX est fort aléatoire, on ne peut être sûr qu'aucune évaporation n'aura lieu lors de l'hybridation. De plus, le DPX pénètre parfois entre le porte-objet et le couvre-objet. Un autre procédé devrait être utilisé, comme par exemple une cassette hermétique de dimension à peine plus grande qu'une lame avec une atmosphère saturée de tampon d'hybridation dans laquelle serait enfermée le damier.

La variabilité et la sensibilité de ce biochips peuvent être considérablement augmentées en employant des ADN-trappeurs humains. Rappelons que le biochips développé ici était constitué de trappeurs synthétisés à partir d'ADNc de rat. Comme nous voulions détecter des ADNc humains, les homologues entre cibles et trappeurs n'étaient pas totales, et, de ce fait, les rendements d'hybridations s'en trouvaient affectés. Si les trappeurs sont parfaitement complémentaires des cibles, ces problèmes d'homologies n'interféreront plus avec l'hybridation.

De même, si les trappeurs sont tous à la même distance, la plus petite possible, du site poly-A de l'ARN-cible complémentaire, les probabilités de synthèse complète de la séquence complémentaire au trappeur seront identiques pour chaque ADNc-cible.

Les aiguilles, si elles sont bon marché, ne sont pas identiques entre elles et provoquent des changements dans la forme et l'homogénéité des spots (études réalisées par N. Zammattéo). Si elles sont précises, très peu variables, elles sont aussi souvent très chères et fragiles au point de ne pas supporter les bains avec ultrasons. Il est important de trouver un compromis entre les deux.

Le tampon MES, s'il offre des caractéristiques propices à son utilisation dans la fixation d'ADN, n'en demeure pas moins instable. Soit il doit être vérifié avant chaque expérience, soit il faut trouver un autre tampon, plus stable mais avec les mêmes caractéristiques, à savoir pH 6,5 et l'absence d'amines qui interféreraient avec la réaction d'attaque nucléophile.

Ces premiers résultats sont encourageants, mais il faudrait réitérer les tests afin de s'assurer de leur reproductibilité. La première chose à faire à l'avenir est de vérifier ces résultats. Il sera alors permis d'agrandir la chips avec d'autres gènes exprimés différemment au cours du vieillissement, et de réaliser ainsi un damier capable d'analyser simultanément beaucoup de variations inhérentes au vieillissement.

On peut cependant s'interroger sur la qualité du contrôle négatif choisi dans ce mémoire, à savoir une séquence du cytomégalo virus humain. Il ne représente aucun ambiguïté pour le tests *in vitro*, par contre si on veut étudier des cellules issues de biopsies de peau par exemple, il y a toujours la crainte de la présence dans l'échantillon de ce virus. Dès lors le CMV serait un mauvais contrôle négatif de l'hybridation.

Pascal T., dans ces travaux de "differential display" sur l'étude de l'expression des gènes au cours du vieillissement induit par des stress au t-BHP, a mis en évidence l'existence de plus de 150 gènes dont l'expression varie. Ce serait une grande perspective que d'inclure sur les damiers ces autres gènes, et étudier de ce fait le vieillissement prématuré induit par les stress

Et, pourquoi pas, d'autres gènes impliqués dans des maladies considérées comme « gérontologiques ». On ferait ainsi d'une biochips un module d'exploration du vieillissement et des pathologies associées. Bien sûr, les maladies dites monogéniques sont peu nombreuses, mais si un seul marqueur génétique d'une certaine maladie est découvert, cela suffira pour l'inclure sur le damier.

Il serait intéressant de posséder plusieurs contrôles internes pour la normalisation, afin d'être certain qu'une variation d'intensité soit bien un phénomène d'expression et non de reproductibilité faible. Les biochips seraient plus fiables et les résultats moins ambigus.

La technique des biochips, si elle est prometteuse, n'en est encore qu'à ses débuts. Chaque nouvelle technique pose ses problèmes, ses désavantages et ses limites, et le biochips pose aussi les siens.

En 2003 est prévu le séquençage complet du génome humain, et cet afflux de nouvelles informations aura besoin d'analyses précises que pourrait fournir la technique des biochips. Il

est donc important de persévéraler dans l'amélioration de cette technique qui contient la promesse d'un outil polyvalent et rapide.

Actuellement, les articles du monde scientifique traitent plus de la technique que des applications possibles. Pourtant, c'est par leurs applications que se promeuvent les nouvelles techniques. C'est pourquoi il faut voir ce mémoire comme étant une volonté de donner aux biochips une application nouvelle.

Chapitre V : Bibliographie

J. F. Allemand, D. Bensimon, L. Jullien, A. Bensimon and V. Croquette (1997).
"pH-dependent specific binding and combing of DNA."
Biophys J, 73(4): 2064-70.

J. C. Alwine, D. J. Kemp and G. R. Stark (1977).
"Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes."
Proc Natl Acad Sci U S A, 74(12): 5350-4.

J. C. Alwine, D. J. Kemp, B. A. Parker, J. Reiser, J. Renart, G. R. Stark and G. M. Wahl (1979).
"Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper."
Methods Enzymol, 68: 220-42.

P. W. Atadja, K. F. Stringer and K. T. Riabowol (1994).
"Loss of serum response element-binding activity and hyperphosphorylation of serum response factor during cellular aging."
Mol Cell Biol, 14(7): 4991-9.

F. M. Ausubel (1987).
"Current protocols in molecular biology".
Greene Publishing Associates ;
J. Wiley order fulfillment, Brooklyn, N. Y.
Media, Pa.

K. Bayreuther, H. P. Rodemann, R. Hommel, K. Dittmann, M. Albiez and P. I. Francz (1988).
"Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage."
Proc Natl Acad Sci U S A, 85(14): 5112-6.

M. Becker-Andre and K. Hahlbrock (1989).
"Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY)."
Nucleic Acids Res, 17(22): 9437-46.

M. Bellis and P. Casellas (1997).
"La puce ADN : un multi-réacteur de paillasse."
Médecine/science, 13(11): 1317-24.

A. G. Bodnar, M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner and W. E. Wright (1998).
"Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells [see comments]."
Science, 279(5349): 349-52.

C. L. Bunn and G. M. Tarrant (1980).

"Limited lifespan in somatic cell hybrids and cybrids."

Exp Cell Res, 127(2): 385-96.

B. Chance, H. Sies and A. Boveris (1979).

"Hydroperoxide metabolism in mammalian organs."

Physiol Rev, 59(3): 527-605.

S. A. Corbett, C. L. Wilson and J. E. Schwarzbauer (1996).

"Changes in cell spreading and cytoskeletal organization are induced by adhesion to a fibronectin-fibrin matrix."

Blood, 88(1): 158-66.

V. J. Cristofalo and R. J. Pignolo (1993).

"Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture."

Physiol Rev, 73(3): 617-38.

J. Cunha-Vaz (1998).

"The ageing population: vision and ageing European challenges."

Biomedical and Health Research, 9(2): 1998.

K. J. Davies (1987).

"Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects."

J Biol Chem, 262(20): 9895-901.

C. Debouck and P. N. Goodfellow (1999).

"DNA microarrays in drug discovery and development."

Nat Genet, 21(1 Suppl): 48-50.

J. DeRisi, L. Penland, P. O. Brown, M. L. Bittner, P. S. Meltzer, M. Ray, Y. Chen, Y. A. Su and J. M. Trent (1996).

"Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer [see comments]."

Nat Genet, 14(4): 457-60.

G. P. Dimri, E. Hara and J. Campisi (1994).

"Regulation of two E2F-related genes in presenescent and senescent human fibroblasts."

J Biol Chem, 269(23): 16180-6.

G. P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith and et al. (1995).

"A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo."

Proc Natl Acad Sci U S A, 92(20): 9363-7.

B. R. DiPaolo, R. J. Pignolo and V. J. Cristofalo (1992).

"Overexpression of the two-chain form of cathepsin B in senescent WI-38 cells."

Exp Cell Res. 201(2): 500-5.

D. J. Duggan, M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer and J. M. Trent (1999).

"Expression profiling using cDNA microarrays."

Nat Genet. 21(1 Suppl): 10-4.

P. Dumont, A. Barez, L. Balbeur, F. Eliaers, O. Toussaint, T. Pascal, J.-F. Dierrick and J. Remacle (1998).

"The role of mitochondrial metabolism in the resistance of fibroblasts to cell death and to accelerated cellular ageing."

Arch. Physiol. Biochem., 106(B28).

W. S. el-Deiry, T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1993).

"WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression."

Cell, 75(4): 817-25.

A. Ferber, C. Chang, C. Sell, A. Ptasznik, V. J. Cristofalo, K. Hubbard, H. L. Ozer, M. Adamo, C. T. Roberts, Jr., D. LeRoith and et al. (1993).

"Failure of senescent human fibroblasts to express the insulin-like growth factor-1 gene."

J Biol Chem, 268(24): 17883-8.

D. H. Geschwind, J. Gregg, K. Boone, J. Karrim, A. Pawlikowska-Haddad, E. Rao, J. Ellison, A. Ciccodicola, M. D'Urso, R. Woods, G. A. Rappold, R. Swerdloff and S. F. Nelson (1998).

"Klinefelter's syndrome as a model of anomalous cerebral laterality: testing gene dosage in the X chromosome pseudoautosomal region using a DNA microarray."

Dev Genet. 23(3): 215-29.

P. U. Giacomoni and P. D'Alessio (1996).

"Open questions in photobiology. IV. Photoaging of the skin."

J Photochem Photobiol B, 33(3): 267-72.

S. Goldstein, J. J. Gallo and W. Reichel (1989).

"Biologic theories of aging."

Am Fam Physician, 40(3): 195-200.

S. Goldstein (1990).

"Replicative senescence: the human fibroblast comes of age."

Science, 249(4973): 1129-33.

E. S. Gonos, J. S. Burns, G. R. Mazars, A. Kobra, T. E. Riley, S. C. Barnett, G. Zafarana, R. L. Ludwig, Z. Ikram, A. J. Powell and P. S. Jat (1996).

"Rat embryo fibroblasts immortalized with simian virus 40 large T antigen undergo senescence upon its inactivation."

Mol Cell Biol, 16(9): 5127-38.

E. S. Gonos, A. Derventzi, M. Kveiborg, G. Agiostratidou, M. Kassem, B. F. Clark, P. S. Jat and S. I. Rattan (1998).

"Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence."
Exp Cell Res, 240(1): 66-74.

Z. Guo, R. A. Guilfoyle, A. J. Thiel, R. Wang and L. M. Smith (1994).

"Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports."
Nucleic Acids Res, 22(24): 5456-65.

L. Hayflick (1961).

"The serial cultivation of human diploid cell strains."
Experimental Cell Research.

R. A. Heller, M. Schena, A. Chai, D. Shalon, T. Bedilion, J. Gilmore, D. E. Woolley and R. W. Davis (1997).

"Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays."
Proc Natl Acad Sci U S A, 94(6): 2150-5.

B. Joos, H. Kuster and R. Cone (1997).

"Covalent attachment of hybridizable oligonucleotides to glass supports."
Anal Biochem, 247(1): 96-101.

N. W. Kim, M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich and J. W. Shay (1994).

"Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [see comments]."
Science, 266(5193): 2011-5.

J. J. Kr se, C. I. Bart, J. W. Leer and J. Wondergem (1999).

"Detection and quantitative measurement of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) gene expression using a semi-nested competitive PCR assay."
Cytokine, 11(2): 179-85.

S. Kumar, A. J. Millis and C. Baglioni (1992).

"Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts."
Proc Natl Acad Sci U S A, 89(10): 4683-7.

T. Kumazaki, R. S. Robetorye, S. C. Robetorye and J. R. Smith (1991).

"Fibronectin expression increases during in vitro cellular senescence: correlation with increased cell area."
Exp Cell Res, 195(1): 13-9.

P. M. Lackie (1996).

"Immunogold silver staining for light microscopy."
Histochem Cell Biol, 106(1): 9-17.

J. B. Lamture, K. L. Beattie, B. E. Burke, M. D. Eggers, D. J. Ehrlich, R. Fowler, M. A. Hollis, B. B. Kosicki, R. K. Reich, S. R. Smith and et al. (1994).

"Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device."
Nucleic Acids Res, 22(11): 2121-5.

B. Lecka-Czernik, E. J. Moerman, R. A. Jones and S. Goldstein (1996).

"Identification of gene sequences overexpressed in senescent and Werner syndrome human fibroblasts."
Exp Gerontol, 31(1-2): 159-74.

H.-C. Lee, R. weindruch and M. J. Aiken (1997).

"Age-associated Alteration of the Mitochondrial Genome."
Free Rad. Biol.&Med., 22: 1259-1269.

M. Z. Levy, R. C. Allsopp, A. B. Futcher, C. W. Greider and C. B. Harley (1992).

"Telomere end-replication problem and cell aging."
J Mol Biol, 225(4): 951-60.

A. M. Lezza, D. Boffoli, S. Scacco, P. Cantatore and M. N. Gadaleta (1994).

"Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles."
Biochem Biophys Res Commun, 205(1): 772-9.

M. H. Linskens, J. Feng, W. H. Andrews, B. E. Enlow, S. M. Saati, L. A. Tonkin, W. D. Funk and B. Villeponteau (1995).

"Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display."
Nucleic Acids Res, 23(16): 3244-51.

S. Liu, R. Thweatt, C. K. Lumpkin, Jr. and S. Goldstein (1994).

"Suppression of calcium-dependent membrane currents in human fibroblasts by replicative senescence and forced expression of a gene sequence encoding a putative calcium-binding protein."
Proc Natl Acad Sci U S A, 91(6): 2186-90.

H. F. Lodish (1999).

"Molecular cell biology".
Scientific American Books, New York.

Z. A. Medvedev (1989).

"The past and the future of experimental gerontology."
Arch Gerontol Geriatr, 9(3): 201-13.

D. Michel, G. Chatelain, S. North and G. Brun (1997).

"Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene."

Biochem J. 328(Pt 1): 45-50.

A. L. Muggleton-Harris and L. Hayflick (1976).

"Cellular aging studied by the reconstruction of replicating cells from nuclei and cytoplasms isolated from normal human diploid cells."

Exp Cell Res. 103(2): 321-30.

A. L. Muggleton-Harris and D. W. DeSimone (1980).

"Replicative potentials of various fusion products between WI-38 and SV40 transformed WI-38 cells and their components."

Somatic Cell Genet. 6(6): 689-98.

S. Murano, R. Thweatt, R. J. Shmookler Reis, R. A. Jones, E. J. Moerman and S. Goldstein (1991).

"Diverse gene sequences are overexpressed in werner syndrome fibroblasts undergoing premature replicative senescence."

Mol Cell Biol. 11(8): 3905-14.

J. R. Nevins (1992).

"E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins."

Science. 258(5081): 424-9.

T. H. Norwood, W. R. Pendergrass, C. A. Sprague and G. M. Martin (1974).

"Dominance of the senescent phenotype in heterokaryons between replicative and post-replicative human fibroblast-like cells."

Proc Natl Acad Sci U S A. 71(6): 2231-5.

C. Y. Pang, H. C. Lee, J. H. Yang and Y. H. Wei (1994).

"Human skin mitochondrial DNA deletions associated with light exposure."

Arch Biochem Biophys. 312(2): 534-8.

O. M. Pereira-Smith and J. R. Smith (1983).

"Evidence for the recessive nature of cellular immortality."

Science. 221(4614): 964-6.

R. H. Pichler, J. A. Bassuk, C. Hugo, M. J. Reed, E. Eng, K. L. Gordon, J. Pippin, C. E. Alpers, W. G. Couser, E. H. Sage and R. J. Johnson (1996).

"SPARC is expressed by mesangial cells in experimental mesangial proliferative nephritis and inhibits platelet-derived-growth-factor-mediated mesangial cell proliferation in vitro."

Am J Pathol. 148(4): 1153-67.

J. Remacle, C. Michiels and M. Raes (1992).

"The importance of antioxidant enzymes in cellular aging and degeneration."

Exs. 62: 99-108.

M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis and P. O. Brown (1995).

"Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [see comments]."

Science, 270(5235): 467-70.

M. Schena (1996).

"Genome analysis with gene expression microarrays."

Bioessays, 18(5): 427-31.

E. L. Schneider and J. W. Rowe (1996).

"Handbook of the biology of aging".

Academic Press, San Diego.

D. Shalon, S. J. Smith and P. O. Brown (1996).

"A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization."

Genome Res. 6(7): 639-45.

D. Shalon (1998).

"Gene expression micro-arrays: a new tool for genomic research."

Pathol Biol (Paris), 46(2): 107-9.

N. W. Shock and Gerontology Research Center (U.S.) (1984).

"Normal human aging: the Baltimore longitudinal study of aging".

U.S. Dept. of Health and Human Services Public Health Service National Institutes of Health

National Institute on Aging Gerontology Research Center;

For sale by the Supt. of Docs. U.S. G.P.O., [Baltimore, Md.]

Washington, D.C.

M. G. Simic, D. S. Bergtold and L. R. Karam (1989).

"Generation of oxy radicals in biosystems."

Mutat Res. 214(1): 3-12.

D. J. Stone, I. Rozovsky, T. E. Morgan, C. P. Anderson and C. E. Finch (1998).

"Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apolipoprotein E-dependent mechanism: implications for Alzheimer's disease."

J Neurosci, 18(9): 3180-5.

O. Toussaint, S. Y. Fuchs, Z. A. Ronai, S. Itoyama, N. Yuko, V. Petronilli, P. Bernardi, E. S. Gonos, P. Dumont and J. Remacle (1998).

"Reciprocal relationships between the resistance to stresses and cellular aging."

Ann N Y Acad Sci, 851: 450-65.

J. G. Wetmur (1991).

"DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization."

Crit Rev Biochem Mol Biol, 26(3-4): 227-59.

J. H. Yang, H. C. Lee, K. J. Lin and Y. H. Wei (1994).

"A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin."

Arch Dermatol Res, 286(7): 386-90.

N. Zammattéo, I. Alexandre, I. Ernest, L. Le, F. Brancart and J. Remacle (1997).

"Comparison between microwell and bead supports for the detection of human cytomegalovirus amplicons by sandwich hybridization."

Anal Biochem, 253(2): 180-9.

N. Zammattéo (1998).

"Etude comparative de l'hybridation de l'ADN sur microplaques et sur microbilles de polystyrène. Application à la détection post-PCR de l'ADN du cytomégalo virus humain."
Biochimie cellulaire, FUNDP, Namur.

CONTENTS

Annexes

Séquence de l'ADNc de SM22 de rat. La séquence grisée correspond au trappeur.

1 agggcggttctcaggcaccttcactggcttggatccctcggggtacaggctgttcacca
61 acttgctcagaatcacgccattcttcagccacacctggaagcccagacagcaacgtact
121 ctcttccagcccacaaacgaccaagccttttctgctcaacatggccaacaagggtcca
181 tcctatggcatgagccgtgaagtgcagtccaagattgagaagaagtatgatgaggagctg
241 gaggagcggctagtggagtggttgaatgcagtgtggccctgatgtgggcccgtccagat
301 cgtgggcgcctgggctccaggtgtggctgaagaatggcgtgattctgagcaagttggtg
361 aacagcctgtaccccagggatccaagccagtgaaggtgcctgagaacccgccctccatg
421 gtcttcaagcagatggaacaggtggctcaattcttgaaggcagctgaggattatggagtc
481 acgaagactgacatgttccagactgttgacctcttgaaggaaaagatatggcagcagtg
541 cagaggactgtaatggctttgggcagtttggccgtgaccaagaacgatggacactaccgt
601 ggagatcccaactggtttatgaagaaagcccaggagcataagaggagggttcacagacagt
661 caactgcaggaggggaagcacgtcattggccttcaaatgggcagcaacagaggggectca
721 caggctggcatgacaggctatgggcgaccccgccagatcatcagttagaagggaaggcc
781 agctctgagctgcagcactctgcttagcctgcctcaccacgacctataggttcttagc
841 cgggacagcttgaggatcactgggcaaagatgactgcacatgggcagctcccacctat
901 cctcagcctcagccccgttcttaccacagagccaccactgtcctggcccctgttcccag
961 ctgtccccccaccttaccgtttccccatcctggagtaagcagggagaagtgggctgag
1021 gtagcctgactgtaggccagccactgtccttgaagccaatgtccttgaagagaccc
1081 tgcctctacatcttttctggaatatTTTTGGGTGAAATCAAAAAGGAAAAAATAT
1141 atacatatatatctccaaaaaaataaaaaaaaaaaaaaaaaa

Séquence de l'ADNc de l'apolipoprotéine-J de rat. La séquence grisée correspond au trappeur.

1 caggaggagcgactggagccaagccgcagacgggactccagactccaaagaggccacac
61 catgaagattctctgctgtgtgtggcactgctgctgacctgggacaatggcatggtcct
121 gggagagcaggagttctctgacaatgagctccaagaactgtccactcaaggaagtaggta
181 tgtaataaggagattcagaacccgtccaggggtgaagcacataaagaccctcataga
241 aaaaaccaacgcagagcgcaagtcctgctcaacagtttagaggaagccaaaaagaagaa
301 agagggtgctctagatgacaccagggtattctgaaatgaagctgaaggctttccggaagt
361 gtgtaacgagaccatgatggccctctgggaagagtgaagccctgcctgaagcacacctg
421 catgaagttctacgcacgcgtctgcaggagcggctcggggctggttggctgccagctaga
481 ggagtttctgaaccagagctcacccttctacttctggatgaacggggaccgcacagactc
541 cctgctggagagtgaaccggcagcagagccaagtcttagatgctatgcaggacagcttca
601 tggggctgtctggcatcatagatacgttttccaggaccggttcttccacccatgagcccca
661 ggacatccaccatttctccccatgggcttccacacaageggcctcatttctgtacc
721 caagtcccgcttggctccgagcctcatgectctctcccactacgggctctgagcttcca
781 caacatgttccagcctttctttgatatgataccaggctcaacaggccatggagctcca
841 gctccatagcccagctttacagttcccgatgtggatttctaaaagaaggtgaagatga
901 cccgacagtgtgcaaggagatccgccataactccacaggatgcctgaagatgaagggccca
961 gtgtgagaagtccaagagatcttgtctgtggactgttcgaccaacaatcctgccaggc
1021 taacctgcccaggagctaaacgactcgtccaggtggctgagaggctgacctgagcagta
1081 caacgagctgtctcattccctccagtccaagatgctcaacacctcatcctgtggaaca
1141 gctgaacgaccagttcacgtgggtgtcccagctggctaacctcacacagggcgatgacca
1201 gtaccttgggtctccacagtgaacaaccatttctgactcagaagtccctctcgtgt
1261 cactgagggtggtgaagctgtttgactctgacccatcacagtgggtgttaccagaaga
1321 agtctccaaggataaccctaagtttatggacacagtggcagagaaagcgctacaggaata
1381 ccgcaggaaaagccgatggaatgagacagaagcatcagttttctatatgtaggagtctc
1441 aaggagggaatctcccagctttccagggtgctgcagaccctagagaactccacatgct
1501 tccagcgcttaggcctccaccccagcagcctctcctctctgggttctgtactctaatg
1561 cctgcacttgatgctctgggaagaactgcttccccacgcaactaatccaataaagccac
1621 ttgccgat

Séquence d'une partie de l'ADN mitochondrial comportant entre autre les trois sous-unités de la cytochrome c oxydase. La séquence grisée correspond au trappeur et se situe dans la zone de la sous-unité III de la CCOX.

```
1 ataaatccaattaccctaaccattatttacttaaccacctttaaggccgcctaatacag
61 acacttagcaccaacttaccaccaatatgagtaggattggaaataagccttttagctatc
121 atcccacttctagccaacaaaaaagcccacgatcaactgaagcagcaacaaaatattt
181 ctaacccaagctacagcctcaataattatcctactagtcacatcctcaactacaaaca
241 tcaggaatatgaacccttcaacaacaaccaataacatactactcaacataatactcatt
301 tcactggccataaaacttgactagccccattccactactgactacccgaagtcacccaa
361 ggaattccccacacattggattaatttactaactgacaaaaaattgctccactatca
421 attctataccaattttatcaactcctaaccctaactatcaccaccattctcgcaatttca
481 tcagctttcgttggcgatgaggaggacttaaccagacgcaaacacgaaaaaccatagcg
541 taccatcaattgccacataggaggaataacggcaatcctccatacaaccctaccctt
601 accctctaacttaacaattaacatcctacttaaggcccaatattcattacactcata
661 acaaatccggcaacaacaataacacactctcaccatagaataaaactcccataatc
721 ctaaccatagcatccatcctcctatcactaggaggactccccctctcacaggattt
781 ttacaaaatgagcaattatctccgagcttctaaaaaacaactgctcaaccctatcaaca
841 ctaatagctatcatagccctattaagcctattcttatactcgactaatttattccata
901 tccctcaccacattcccaaccaacaacaactccaaaataatctcccaccacaaaacca
961 aaacataattttatcctcccaaccctcacagtattaagtaccctaaccctaccgcttcc
1021 tcccaactaatcacatagaagtttaggatatagctcaagagcctcaaaagccctaga
1081 aaacaacaagtttaacttctgataaggactgtaagactatattacatctgttaaag
1141 caaatcaactgcttaattaagctaaatcctcaactagattggaaggaaatcaattccta
1201 cgaaaatttagttaacagctaaataccctacttactggctcaatctacttctccgcct
1261 atcagaaaagaggcgggagagccttagtagaggagattctctacacctegaacttgca
1321 attcgacatgataatcaccttaaggcttttggtaaaagggggctcaaccctgtcttt
1381 agatttacagtctaatgcttactcagccattttacctatgttgtaaacgttgactctt
1441 ttcaactaaccacaagataatcggaaccctctacattattttggagcctgagcaggaat
1501 agtagggacagctttgatttctaatcagctgaactaggacagccaggcgcactcct
1561 aggagatgacaaatctataatgtcctcgtcacagccatgcatctgtaataattttctt
1621 tatagtaatactataataattggaggttcggaaactgacttgaccactaataattgg
1681 agccccgatatagcattcccacgaataaataacataagctttgactgcttctccatc
1741 atttctactccttttagcctcctcatagtagaagctggagctggaacaggatgaacagt
1801 atatcccccttagccggaacctagcccatgctggggtatccgtagatttaacttttt
1861 tccctccacctagccgggtgtcttctatcttaggagctatcaactttatcaccactat
1921 cattaatataaaacccccctgtataaccaatatacagacacctctcttgtatgatccgt
1981 actaattacagcctgctactacttctcactgccagtattagcagcaggtatcactat
2041 actccttacagaccgaaatctaaataactatttcttcgaccccgctggaggtggagacc
2101 aattctttatcaacacctattctgattcttcggccaccagaagtgtacatcttaattct
2161 tccagggtttggaattatttcacatgtagttacctattactctggaaaaaagaaccctt
2221 cggatatataggtatggtatgaaccataatatctattggcttctaggatttattgtatg
2281 agcacatcacatattcacagtaggcctagatgtagacaccgagcctactttacatctgc
2341 cactataattatcgcaattcctacaggcgtaaaagtattcagctgactcgtactacata
2401 tggaggaaatatcaaatgatccccgccatattatgagccttagggtttattcttatt
2461 cacagtagggggcctaacaggggatcgtactatctaactcatcccttgacattgtactca
2521 tgatacactactagtagtctcacttccactatgtcttattctataggagcagtattcgc
2581 catcatagctggcttcgtccactgattcccactattctcaggctataccctaaatgacac
2641 atgagcaaaagcccactttgccattatattgtaggtgtaaacataacatttttctca
2701 acacttctaccattagcagggatacctcgtcgttactctgattatccagatgcttatac
```


2761 cacatgaaatacagtctctctataggetcattcatctcacttacggccgtccttgtaat
2821 gatcttcatgatttgagaagccttcgcatcaaaacgagaagtgcctcatttctactc
2881 ttcaactaacctagaatgactgcatggatgccccacctaccacacattcgaagaacc
2941 ttctatgtaaaagttaaataagaaaggaaggaatcgacccctacaactggttcaagc
3001 caatttcataaccattatgtctttcfaatgagatattagtaaaataattacataacctt
3061 gtcaagggttaagttagacctaatectatatcttcatggcttaccatttcaactt
3121 ggcttacaagacgtacatcacctatcatagaagaacttacaactttcatgaccacacc
3181 ctaataattgtattcctcatcagctccctagcttattattttactaataactaaca
3241 acaaaactaacacacacaagcacaatagacgccaagaagtagaacaattgaacaatt
3301 ctccagctgtcattcttattctaattgcccttccctccctacgaattctatacataata
3361 gagagattaataaccaggttcaacagtaaaactataggacaccaatgatactgaagc
3421 tatgaatatactgactatgaagacctatgcttgactctacataatccaaccaatgac
3481 ctaaaaccaggtgaacttcgtctattagaagtgataatcggttagcttaccatagaa
3541 ctccaattcgtataactatctcaccgaagacgtctgcactcatgagccatcccttca
3601 ctagggttaaaaaccgacgcaatccccggccgcctaaaccaagctacagtcacatcaaac
3661 cgaccaggtctattctatggccaatgctctgaaatttgcggtcaaatcacagcttcata
3721 cccattgtactagaaatagtgccctctaaaatatttcgaaaactgatcagcttctataatt
3781 taaactcattgcgaagcttagagcgtaaccttttaagttaaagttagagacaacaatc
3841 tccaatgacatgccacaactagacacatccacatgattattacaatcatctcctcaa
3901 tagccacactattttatttcaattaaaaatttctccaaaccttctgcacctc
3961 cctcacccaaaactatagccacagaaaaaacgaataacccttgagaatcaaatgaacga
4021 aaatctatttgctctttcattacccccacaataataggcttaccattgtgtgacct
4081 tattatgttccatcaattctattcccatcatcagaacgcctaatcagcaaccgactaca
4141 ctcatccaactgactaatcaaaacttatcatcaaaaaaatgttaattcacacacc
4201 aaaaggacgaacctgagccctaataattgtatccctaattatatttggctcaaccaa
4261 ccttctagggtcttctcccatatacttaccctaccactcagctatctatagacctaa
4321 catagccatccccctatgagcaggagccgtaattctaggttccgacacaaactaaaaaa
4381 ttcttagcccacttctcaccgcaaggaacccccatctactaattcccataactaatcat
4441 catcgaactatcagcctattttcaaccgatagcactagcaagtacgactaacagcaa
4501 acattacagcaggccatctattaatgcatctaactcgaggagctaccctagtacttatag
4561 acatcagcccaccaaccgctacaattacatttatttacttctacttacagtacttg
4621 aatttgccgtagccttaattcaagcctatgtattcacccttctagtcagcctgtacctac
4681 atgataacacataatgaccaccaaacccatgcataccatatagtaaaccaagcccatg
4741 accactaacaggagccctatcagctcttctactcacatccggcttagtaatatgattcca
4801 ttacaactccacaattctctatcattaggcctctgacaaacatcctaactatatatca
4861 atgatgacgagatatcatcgtgaaggaacataccaaggccaccacacccctattgtaca
4921 aaaaggcctccgatacggataatcctgtttattgtctccgaagtattcttcttgcggg
4981 attttctgagcattttatcattccagcctagtctaccacgacctaggcggttgctg
5041 accccaacaggaatcacccctttaaattccctagaagtaccccttetaaataca tcagt
5101 cctcttagcatcaggagtctcaattacatgagcccatcacagecctaataagaaggcaaccg
5161 aaaccatataaaceagccctactaatcaccattctcttaggattatatttactatctt
5221 acaagcctcagagtatttgaacacatctttctatctcagacggaaattacggctcaac
5281 atttctcatgaacgggatttcatggcctccacgtaattattggctcaacttccataat
5341 tctctgtctactacgacaactaaaattcacttccatcacaacacatttggatttga
5401 agccgcagcatgatactgacacttcgtatgtatgttgaacttctatagcttctat
5461 ctattgatgaggatcctactcccttagtataaacaatacaactgacttccaatcagttaa
5521 ttctgaaaaaactcagaagagagtaattaacctaccattatcatcacaattaacatcac
5581 ctatctcttctcctcatttcaattgcattctgattgctcaataaacttatactccga
5641 aaaagcaaacccatagatgtggcttcgaccaacaagttctgcacgccttcttttct
5701 aataaaattttcttagtagccattacatttctacttctgacctagaaatgccttact

5761 acttcccctcccatgagcgattcaaacaaccaataccactacaataatagcaactgcctt
5821 tatttttagtcactattttgtctcttggcctagcctacgaatgaacacaaaaaggactaga
5881 atgaacagaataattggttaattagtttaataaaaattaatgatttcgactcattagatta
5941 tgataataatcataattaccaacaatgacatctgctttcctaaatttaactatagccttt
6001 acattatctctactaggtacttttataatttcgctcccacctaataatccactctcctctgc
6061 ctagaaggaataatactatcactatttgtcataacttcaacatccacattaaactccaac
6121 tccataatctccataaccatcccaattaccattctagttttgcagcctgcgaagcagca
6181 gtaggttttagccttactagtaaaaatttcaatacttacggaacagactacgtacaaaaac
6241 ctcaaccttctacaatgttaaaaaatttttcccatctatcatactcctcccactaacat
6301 gactctcagccaacaaaaaatctgaaccaatgtcacctcctacagctttctagttaggcc
6361 tattaagcttatcactcctatgacaaaaatgacgaaaattacctaaatttctcagtatat
6421 tctcctccgatccattatccaccccactaatcattctaacaacttgactcctcccactaa
6481 taatgctcgtagccaaaatcacataaaaaagaaaatataatgcatcaaaaactttaca
6541 tctcaatacttattagcctccaaattttactcatcataacattctcgcacagaactaa
6601 ttttttttatatcctgttcgaggccactctaatacccaactaattatcattacacgat
6661 gaggcaaccaaacagaaacgcttaaatgcaggaatttattcctgtttatacactaattg
6721 gctccatccactcttaattgcctcatttcaatccaaaactcaataggaacactcaact
6781 tctaatcctttccctcacacacacccctaccctcaacatgatccaacaccattctat
6841 gactagcatgtataatagcatttataatcaaaataccattatacggagtcacatctatgat
6901 taccaaaagcccacgtagaagctccaattgcaggctctataattttagcagcaattctcc
6961 taaagctaggggggttatgggataatacagagtttccatcattctagacccctaacaaaat
7021 ctttagcctaccattcatcctctcattatgaggcataattataactagctcaatct
7081 gcctacgccaacagatctaaaatcattaattgcttactcatcagtaagccatatagccc
7141 tagtcacacagccattataatccagacaccatgaagcttcatgggagccacaataactaa
7201 taatgccccacggcttaacctcatcactcttattctgcctagcaaacaccaactacgaac
7261 gaattcacagccgaactataattatagctcgaggattacaaataatctttcattgatag
7321 caacatgatgactattagcaagcttagccaaccttagcactaccacccctaattaacctca
7381 taggcgagttattcattgttagcaacattttcctgatcgaacccctctatcatcctta
7441 tagcaactaacattgtcatcacaggaatatactcaatatatatgattatcacacccaac
7501 gaggaaaactaaccagccacataaacaacctccaaccttcccacacacgagaattaacac
7561 tcatagctctacacattattcccctcatactattaacaatcaaccctaaactcatcacag
7621 gcctaacaatat

Séquence de l'ADNc de la fibronectine de rat. La séquence grisée correspond au trappeur.

1 ctcgcacccgctgcactgcacaggggaagaaaaggagcccagggtgtgagccggccagcg
61 gccacaactcttggtcctctcccgtgctccttccatcttcttacaggcgctccccacct
121 caggacttttctgcaggctgcgaggggaaccaacttcgtggccactagcctcctggaga
181 gggcgactctctcccactcaagatgctcaggggtccgggacccggcggtgctg
241 ctgctagcagctctgtgcctggggacatcggtgcgctgcaccgaaaccgggaagagcaag
301 aggcaggctcagcaaatcgtgcagcctccgtccccgggtggctgtcagtcagagcaagcct
361 ggctgtttgacaacgggaagcattatcagataaatcagcagtggaacggacctaccta
421 ggcaacgccctggtttgtacctgctatggaggaagcagagggtttaactgcgagagcaag
481 cctgaacctgaagagacctgtttgacaaatacactggaaacacttacaagtgggtgac
541 acttatgagcgcctaaagattccatgatctgggactgtacctgcattggggctgggcga
601 ggcaggatcagctgtaccattgcaaatcgtccatgaaggggtcagtcctacaagatt
661 ggtgacaagtggaggaggccacatgagactggtggctatattgttgagtggttgctg
721 gggaatggaaaaggggaatggacctgcaagccaatagctgagaaatgtttgatcacgct
781 gctgggacttctacgtcgtgggggagacctgggaaaagccctaccaaggctggatgatg
841 gtggactgtactgtctggcggaaggcaatggcggtatcacctgcacctcccggacaga
901 tgcaatgatcaggacaccaggacgtctacagaattggagacacatggagcaagaaggac
961 aacagaggggaacctgtctcagtggtctgcacaggcaacggcagaggggagtggaaagtgt
1021 gagcgacatgttctacagagtgtctcagctggatctggctccttcacagatgtccgaaca
1081 gctatttaccacccagaccaccccccagcccgaccgtacggccactgtgtcacagac
1141 agcgggtgtggtctactctgtgggaatgcagtggctgaagtctcaaggagacaagcagatg
1201 ctgtgcacttgccctgggcaatggcgctcagctgccaggagacagctgtgaccagacttac
1261 ggtggcaactcaaacgggggagccctgtgttctcccgttccactacaacggtaggaccttc
1321 tactcctgcaccaccgaagggcggaagacggacatctgtggtgtagcacaactcaaat
1381 tatgaacaagaccagaagtattcttctgcacagaccacgcggttttggtcagactcga
1441 ggtgggaattccaatggtgcttgtgccacttcccctcctgtacagcaaccggaattac
1501 agcgactgtacttctgagggttagcggggacaacatgaaatggtgcggcaccaccagaac
1561 tacgatgccgatcagaagtgttgattctgccaatggctgccccatgaggagatctgcacg
1621 accaacgaaggggtcatgtatcgcattggggaccagtgggataagcagcatgacctgggc
1681 cacatgatgaggtgcacgtgtgttggaacggccgtggacaatgggcctgcatcccctac
1741 tcccagctccgagatcagtgcatcggtgatgacattacttacaacgtcaacgacacgttc
1801 cacaagcgtcacgaggaggacatatgtgaactgtacctgctcggtcagggccggggc
1861 agatggaaatgtgacccatcgaccgatgccaagattcagagaccggacattttaccag
1921 attggtgactcctgggagaagtttgtcatggtgtcagataccagtgttactgttacggc
1981 cgtggcattggggagtggcactgccagcctctgcagacctaccaggcacaactggacct
2041 gttaagtaattatcacggagaccccccagccagcccaattcccacccatccagtggat
2101 gccccggagccttcacacatcaccaagtacattctcaggtggagacctaaaacctctacg
2161 ggtcgtggaaggaaagctaccattccaggccaccttaactctataccatcaaaggcctg
2221 accccaggtgtgatctacgagggacagctcatcagcatccagcagtagggcaccaagaa
2281 gtgactcgtttgacttcaccaccagcgccagcacacctgtgaccagcaacacagtgact
2341 ggagagactgcgcccttttctcctgtgttgccacttccgaatctgtcactgaaatcaca
2401 gccagcagcttcgtggtctcctgggtctcagcttccgacacgggtgtcaggattccgagt
2461 gagtacgaactgagcgaggaaggagatgagcctcagtaccttgatctccaagcacagcc
2521 acttctgtgaacattcctgacctgtccccgggcagaaaagtacatcgtaacgtctatcag
2581 atatctgaagaggggaaagcagagcttgatcctgtctacatcacagactacagcacctgat
2641 gcgcctccagacctactgtggaccagggtgatgacacttcattgttgcgatggagc
2701 agacccaggcacctatcacagggtacaggattgtctattcaccttcagtagaaggcagt
2761 agcacagaactcaaccttctgaaacggccaactccgtcacctcagcgacctgcagccc
2821 ggtgttcagtacaacatcactatctatgctgtggaggagaaccaggagagcacaccgtt

2881 ttatccagcaggagactactggcgctcccacgatccgatgatgttcccgtccaaaggac
2941 ctacagtttgggaagtaccgcagtgaaagtcaccatcatgtggacacctcctaatagc
3001 gcagtgcactggataccgtgtggatgtcctgtcaacctgccaggggaacatgggcag
3061 aggtgcctgtcaacagggaacacctttgtctgaagtcacggactgtccccaggggtcag
3121 tacctcttcaaagtctttgtgtgcatcagggcagggaaagcaagcctctgacagcaca
3181 cagaccaccaaactcgatgtcccactaacctccagtttgcataaaggaacgacagaaca
3241 gttctgtaacttgactccacctgagccccgatagcaggctaccgactgacagtgggc
3301 ctacccgaggaggccagcccaagcagtacaatgtgggacccatggctccaagtatccc
3361 ctgagaaatctgcagcctgggtctgagtacactgtgacctgatggctgtgaaaggcaac
3421 cagcagagtcccaagccaccggagcttttactacctgcagcctctgcgtccattcca
3481 ccttataacaccgaggtgacagagaccacaatcgatcacctggacccccgtccaagg
3541 attggctcaagctgggtgtacgaccaagccagggaggtgaagcaccgcagaagtact
3601 tcagactcaggaagcatcgttgtgtgcttgactccaggcgtggaatacacgtacacc
3661 atccaagtcctgagggacggccaggagagagatgcaccaattgtcaaccgagtagtgaca
3721 ccgctgtctccccaaccaactgcacctggaggccaatcctgacactggagtgttacc
3781 gtctcctgggagaggagcaccaccccagataattactggctacagaataaccaccacccc
3841 acaaacgggcagcaggggaaccgctttggaagaagtggttcatgccgatcagagttcctgc
3901 acttttgaiaaccgtaatcctggcctggagtacaatgtcagtgttactgtcaaagat
3961 gacaaggaaagtgccttatctgtgataccgtcatccagaggtgccccagctcactgac
4021 ctaagctttgtgatataactgactcaagcatcgccctgaggtggaccccgctaaactct
4081 tccaccattatcggtaccgaatcacagtagtgcggcaggagaaggatccccattttt
4141 gaagattttgtgactcctcagtaggatactacacagttacagggtggaaccggcatt
4201 gactatgacatcagcgttatcactctcattaatggcggagagagtgccttactacactg
4261 acacagcaaacggcgtccctcctcccacggatctgcgattaccaatatcggtccggac
4321 actatgcgggtcacttgggccccgcctccgtccattgagtaaccaaccttgggtgcgc
4381 tactacctgtgaagaacgaggaggtatgtggcagagctgtccattcacctcagacaac
4441 gccgtggtcctaacaatatcctgctgggactgagtacctagtcagtgctccagcgtg
4501 tacgaacagcatgagagcatacctctcagagggaagacagaaaacaggtctggactcccca
4561 actggttttgattcttctgatgtcaccgccaactcattcacctgactgggtggctcct
4621 cgggcccccatcacggctacatcatccgccatcacgccgagcattctgccggaagaccc
4681 aggcaagaccgagtgccgccctcaagggaattctatcacctcaccaacctaatccgggc
4741 acggagtacattgtcaccatcattgtttaatggcagagaggagagccccactgatt
4801 ggccagcaatccacggtttccgatgtcccagagatctggaggtcagcttccaccccc
4861 accagcctgtcatcagttgggaacccccgcctctctgtgcgtattacagaatcacc
4921 tatggagagacaggaggaaatagccctgtccaggaattcactgtgcccgaagcaagtc
4981 accgccaccatcaacaacattaaaccaggagcagactacaccatcacctgtatgtgtc
5041 actggccgtggggacagtccagccagcagcaagccagtttccatcaattatcaaacagaa
5101 attgacaagccatccagatgcaggtgacggatgtccaggacaacagcatcagtgtagg
5161 tggtgccttcaacttctcctgtgacaggttacagagtgaccaccgctccaaaaatggc
5221 ctaggaccaacaaatctcaaatgtcagtcagatcaaacagaaatgaccattgaaggt
5281 ttgcaaccaccgtggagtatgtggttagtgtctatgtcagaaccgggaacggagaaagc
5341 cagccctggttcagactgcagtgaccaacattgaccgccctaaaggactggcattcact
5401 gatgtggatgtcgattccatcaaaattgcctgggaaagcccacaggggcaagtttcagg
5461 tacagggtgacctactcaagccctgaggatggaatccatgagcttttccctgcgcctgat
5521 ggtgacgaggacacggcagagctgcacggcctcagggcggttctgagtacacagtcagt
5581 gtggttgcttgacaggtggcatggagagccagcccctgattggagtccagtcacagcc
5641 attcctgcgccaaccaatctgaagttcactcaggtgtcaccaccacctgactgccag
5701 tggacagcggcagtgtaagctcactggctaccgagtgcggtgacccgaaggagaag
5761 acaggaccaatgaaagaaatcaaccttttccagacagcacctccgtgattgtgcagg
5821 ctcatggtggccaccaagtatgaagtcagcgtctatgtctcaaggacacattgacaagc

5881 agaccagctcagggagtcgtcacgactctggagaatgtcagccctccaagaagggcccg
5941 gtgaccgacgctacagaaactaccatcactattagctggagaacgaagacagagacgatc
6001 actggttccaagtcgatgccattccagccaatggccagacccccgggtcagaggaccatc
6061 agccccgatgtcagaagctatactattacaggtttacagccaggcactgactacaagatc
6121 cacctgtacacgctcaacgacaatgcccgagctctcctgttggtcattgatgcctccacg
6181 gccattgatccccatccaacctgcggttctgaccaccacaccaactccttgctgta
6241 tcatggcaggcaccctgccaggattactggctacattatcaagtatgagaagcctgga
6301 tcccccccagagaagtggctccctggccccccctgggtgcacggaggccaccatcact
6361 ggtctggagccagggaaccgagtacaccatctatgtcatcgcactgaagaacaatcagaag
6421 agtgagccctgattgggaggaaaaagacagatgagcttccccaaactggttaccctcca
6481 caccceaattcttaccgaccagagatcttggatgttccctccacagttcaaaagaccccc
6541 ttcgtaccaacctgggtatgacaccgaaaatggtattcagcttctggcacatccac
6601 caacaacccagtgttgggcaacaaatgatctttgaggaacatggctttaggcgaaccacg
6661 ccaccactgcggccacccccgtcaggcttaggccaagaccatacctgccgaatgtagat
6721 gaggagggtccaaatcggtcatgttccaggggagacgtagactaccacctctatcctcat
6781 gttccggggctcaatccaaatgcctctacaggacaagaagctctctcagacaaccatc
6841 tcttgacgccattccaggagagttctgagtacatcatttcatgccaaactgttggcact
6901 gacgaagagcccttacagttccaagttcctggaacttctaccagtgcgactctgactggc
6961 ctaccagaggggtcacctacaacatcatagtggaggccctgcacaaccagaggaggcac
7021 aagggtccgagaagaggtgttactgttaggcaacactgtcaacgaaggcctgaaccagcct
7081 acggatgactcatgctttgaccttacacgggttccattacgccgttgagaggaatgg
7141 gagcggttatctgactctggctttaagctcacttgccagtgttgggctttggcagtgtt
7201 catttcagatgcgattcatctaaatggtgccatgacaacggtgtcaactacaagatcgga
7261 gagaagtgggatcgtcagggagaaaatggccagcggtatgagctgcacatgtctcgggaat
7321 ggaaaggggagaatcaaatgcgatcccatgaagcaacgtgttatgacgacgggaagacc
7381 taccacgtaggagaacagtggcagaaagagtatctcggagccatttgcctgcacgtgt
7441 ttggggggccagcggggctggtgctgtgacaactgccgcagacctgggctgctgaacc
7501 agtcccgatggtaccactggccacacctacaaccagtatacacagagataccatcagaga
7561 acgaacactaatgtaattgccccaaatgaatgcttcatgccgttggaegtgcaggctgac
7621 agagatgattccagagagtaattctttccatccagcccaagccaacaagtgtctctacc
7681 aaggtaatccacacccccagtgtatgttagcagacctccatttctgagtggctatttcc
7741 ccttaagccttctgctctggagtcaagttctcagcttcagctcaacttacagcttctcca
7801 agcatcgccccgcgggatgtttgagacttccctcttaaatggtgacagttggtgccctg
7861 ttctgttcagggtattcagtagtctcagttattgttctaaagagaatcaaaagtctt
7921 gtgatttggctgtgggatcaaaagggaacacaggtagccaaccacgatgcaatgaattgaa
7981 tggtagtaccacagagcgggagcaggaagttaaaccagacagttctgcttctttgccg
8041 tctgatctgcagcactgtcaggaggcctgtcctgtggtgtgtccaaacaccccacagga
8101 ctactgtcccaacaatcctaattgctagaaatatcttctcttacctgttattatca
8161 attttccagttattttatatacggaataattgtattgaagacactttgtatgcagttga
8221 taagaggaattcagttataattatggttggtgactattttataatgtacatgccaaact
8281 ttactactgtggaagacaagtgtttaataaaaagatttacattccat

Séquence de l'ADNc de la GAPDH humaine. La séquence grisée correspond au trappeur.

1 gtcgccagccgagccacatcgtcagaacacctatggggaaggtgaaggtcggagtcaac
61 ggatttggctgtattgggcgcctggcaccagggctgctttaactctggtaaagtggat
121 attgttgcacatcaatgaccccttcattgacctcaactacatggtttacatgttccaatat
181 gattccacccatggcaaattccatggcacgctcaaggctgagaacgggaagcttgtgatc
241 aatggaaatcccatcaccatcttcaggagcgagatccctccaaaatcaagtggggcgat
301 gctggcgctgagtacgtcgtggagtccactggcgtcttcaccaccatggagaaggctggg
361 gctcatttgcaggggggagccaaaagggtcatcatctctgccccctctgctgatgcccc
421 atgttcgtcatgggtgtgaacctgagaagtatgacaacagcctcaagatcatcageaat
481 gcctctgcaccaccaactgcttagcacccttgccaagggtcatcatgacaactttggt
541 atcgtggaaggactcatgaccacagtcctatgccatcactgccaccagaagactgtggat
601 ggccccctcgggaaactgtggcggtatggcgcggggctctccagaacatcatccctgcc
661 tctactggcgctgccaaggctgtgggcaagggtatccctgagctgaacgggaagctcact
721 ggcatggccttcctgttccccactgccaacgtgtcagtgggtggacctgacctgccgtcta
781 gaaaaacctgccaatatgatgacatcaagaagggtggtgaagcaggcgctcggagggcccc
841 ctcaagggtacccctgggtacactgagcaccaggtggtctcctctgacttcaacagcgac
901 accactcctccacctttgacgtggggctggcattgccctcaacgaccactttgtcaag
961 ctcatctcctggtatgacaacgaatttggtacagcaacagggtggtggacctcatggcc
1021 cacatggcctccaaggagtaagaccctggaccaccagccccagcaagagcacaagagga
1081 agagagagaccctcactgctggggagtccctgccacactcagtccccaccacactgaat
1141 cccccctcctcacagttgcatgtagaccctgaagaggggaggggcctagggcgccgca
1201 ccttgcacgtacctcaataaagtacctgggcttacc

Séquence de l'ADNc de la GTP-binding protein de rat. La séquence grisée correspond au trappeur.

```
1 gcagcagcagctccccgggctcctgctctgctcgcctcggccccggagcgagggcgga
61 gagccgcgcgttgccctagtcgagccgccacctccccgcgttccccgtttcccggc
121 ccgccccgagccgccccgccccgccccgccccgagcccgccgccccgccccg
181 ccattgggctgctcggcaacagtaagaccgaggaccagcgcaacgaggagaaggcgagc
241 gcgaggccaacaaaaagatcgagaagcagctgcagaaggacaagcaggtctaccgggcca
301 cgcaccgcctgctgctgctgggtgctggagagtctggcaaaagcaccattgtgaagcaga
361 tgaggatcctacatgttaattgggttaacggagagggcgggcgaagaggacccgcaggctg
421 caaggagcaacagcagtggtgagaaggccaccaaaagtgcaggacatcaaaaacaacctga
481 aggaggccattgaaccattgtggccgcatgagcaacctggtgcccccggtggagctgg
541 ccaacctgagaaccagttcagagtggactacattctgagcgtgatgaacgtgccaaact
601 ttgacttccacctgaattctatgagcatgccaaggctctgtgggaggatgaggaggttc
661 gtgctgtctacgagcgctccaacgagtagcagctgactgtgccagtacttctctgg
721 acaagattgatgtgatcaagcaggccgactacgtgccaagtaccaggacctgcttgcgt
781 gccgcgtcctgacctctggaatctttgagaccaagttccaggtggacaaagtcaacttc
841 acatgttcgatgtggcgccagcgcatgaacgccgcaagtggatccagtgttcaatg
901 atgtgactgccatcatcttctggtggccagcagcagctacaacatggtcatccgggagg
961 acaaccagaccaaccgtctgcaggaggctctgaacctcttaagagcatctggaacaaca
1021 gatggctgcgtaccatctctgtgatccttcttcaacaagcaagatctgcttgcgtgaga
1081 aggtctcgtctgggaaatcgaagattgaggactactttccagagttcgtcgtacacca
1141 ctctgaggatgcgactcccgagccgggagaggaccacgcgtgacccgggccaagtact
1201 tcatccgggatgagttctgagaatcagcactgctagtggagatggacgtcactactgct
1261 accctcactttacctgcgccgtggacactgagaacatccgccgtgtcttcaacgactgcc
1321 gtgacatcatccagcgcatgcatcttcgccaatacagagctgctctaagaagggaacgcc
1381 aaatttaattcagccttaagcacaaattaattaagagtgaacgcaatcgtacaagcagtt
1441 gatcaccaccatagggcagatcaacaccgcaacctttcccttttctccccagtgattc
1501 tgaaaaccccccttcccttcagcttgcttagatgttccaaatttagtaagcttaaggcg
1561 gcctacagaagaaaaagaaaaagaaaggccacaaaagtccctctcactttcagtaaa
1621 taaaataaaagcagcaacaacagaaataaagaaataaatgaaataaatgaaactaaaa
1681 tgaaataaatattgtgtgtgcagcattaaaaaatcaaaataaaataaaatgagc
```


Séquence de l'ADNc de l'ostéonectine de rat. La séquence grisée correspond au trappeur.

1 tctgtgcctgcccactgcctgcctgtgccgagagttcccagcaccatgagggcc
61 tggatcttcttctccttgcctggccgggagggccctggcagcgctcagacggaagct
121 gcagaagagatggtggcggaggaaaccgtggtggaggagacagggttacctgtgggtgcc
181 aaccagtcaggtggaaatgggagagttgaagaagggtgcagaggaaactgtcaggag
241 gtggtggctgaaaaccctgccagaaccatcattgcaaacatggcaagggtgtgtgagctg
301 gacgagagcaacacccccatgtgtgtgtgccaggacccaccagctgccagctccatt
361 ggcgagtttgaagggtgtgcagcaatgacaacaagacctcgactcttctgccacttc
421 ttgcgaccaagtgcaccctggagggcaccagaaggggccacaagctccacctggactac
481 atcggaccatgcaatacatgtccccctgcctggattctgagctgaccgaattccctctg
541 cgcagcgtgactggctcaaaaacgtcctggtcacctgtacgagagagatgagggcaac
601 aacctctcactgagaagcagaaactcgtgtgaagaagatccacgagaacgagaagcgc
661 ctggaggtgagaccacctgtggagctgctggcccagactttgagaagaactacaac
721 atgtacatcttccctgtccactggcagtttgccagctggatcagcaccgattgatggg
781 tacctgtcccacacggagctggccccactgcgcgctccctcattcccatggaacattgc
841 accactcgtctttagacctgtgacctagacaatgacaagtacattgccctggaggaa
901 tgggcccgtgcttcggcatcaaggagcaggacatcaacaaggatctggtgatctaagt
961 caagcctcctgcagcagctcctggactctctccccctgatgtccccaccactccactac
1021 cccctgtttaaaatgttggatggttgctgttctgcctggggataagggtctaacata
1081 gatttaactgaatacattaacggtgctaaaaaaaaacaaaaacaaaaaacagaaaga
1141 aagaaaccagatcccaagtcacagcatttcccacgttactcgaactctgaggccatagcc
1201 tatccacagcctcctcgtccctgcaccgccagtgctcactggctgtgttgaaacgg
1261 gaattgcataagcttgccttctcaagcaagaaatatctctagctttcatttccatttg
1321 actettaacactcaccagactctgtgcttatttcatttgggggggggtgtgggcttct
1381 ggggtcttccctggtagtttgaggtaggcagagggaagttacagacacagatacaaaa
1441 cttgggcaaggacgtctgaggccagtcagaaccagatggcaagtcttggtagcctaggt
1501 caacgactgacagaataatccagagctctgatgcacaaaacagactcccagcagccggg
1561 accttgetgtctctccactctcaggcagtttcttccatgtttggtgttggtttaa
1621 tttgtgagccaaggggaggcatgggcagaccaatactcactagggattctcttactc
1681 aactgctatagggttccaggtcttgcctgggagctctaggcactgggctacaggaaagt
1741 gagactcaagaggaagacagagaagggttgtaacgtagagagagtgagtcataaagtcca
1801 agcatgccccccccacctctccccacccttgccagttgaaacttactaatcaagagaaa
1861 ctccaagccaacggaaggaatggtcggatcccacaggctgagaattgttccccctcaa
1921 gcatttcatgaaaaagctgcttctcattaacctatgcgaactctcacagtgtgtgaagag
1981 cttgacagatcttcaaaaataaaaagtaatgacttagaaatggcc

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.

Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

14 JUIN 1999

X

BUMP



0 0 8 7 6 9 9 0 1

*FM B04/1999/07

